UEBER DIE

BUTYLALKOHOLGÄHRUNG

UND DAS

BUTYLFERMENT

VON

M. W. BEIJERINCK.

Verhandelingen der Koninklijke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam.

(TWEEDE SECTIE.)

DEEL I. N°. 10.

AMSTERDAM,
JOHANNES MÜLLER.
1893.



UEBER DIE BUTYLALKOHOLGÄHRUNG UND DAS BUTYLFERMENT,

VON

M. W. BEIJERINCK.

Es handelt sich bei dieser Gährung um den normalen Butylalkohol, welcher bei 117° C. siedet und in 12 Theilen Wasser löslich ist, woraus er durch Chlorcalcium abgeschieden werden kann. Durch Oxydation wird er in normale Buttersäure übergeführt. Dieser Alkohol ist nicht allein Product der auf den folgenden Seiten zu beschreibenden Gährung, deren Ferment ich fernerhin als *Granulobacter butylicum* bezeichen werde, sondern man findet davon kleine Quantitäten auch bei anderen Gährungen, besonders bei der Buttersäuregährung von Glukose, Rohrzucker, Glycerin und Mannit [1]), deren Urheber *Granulobacter saccharobutyricum* genannt werden mag. Im Gartenboden ist ein Streptokok-artiger Spaltpilz verbreitet, welcher aus concentrirten Maltosewürzen etwas Butylalkohol erzeugt. Ferner fand ich einmal in einer Aussaat von Erde vom Senegal, welche mit Erdnüssen übergekommen war, unter zahlreichen Kolonien von *Bacillus megatherium*, ein Clostridium, welches, vorübergehend, in Würze viel Butylalkohol bildete. Ich glaube darum, dass bei weiterer Aufmerksamkeit, normaler Butylalkohol sich als ein ziemlich verbreitetes Product des Bacterienlebens ergeben wird. Das Ferment, welches ich nachfolgend beschreibe, ist bisher nicht von dem Buttersäureferment unterschieden, womit es auch thatsächlich nahe verwandt ist. Von diesem letzteren Fermente werde ich unten eine Diagnose geben, und hoffe darauf später zurückzukommen bei einer allgemeinen Besprechung der spontanen Gährungen in Mehl-

[1]) A. Fitz. Ueber *Bacillus butylicus*. Berichte d. D. chem Gesellschaft, Jahrg. 15, pag. 867, 1882. *Bacillus butylicus*, Fitz, ist identisch mit meinem *Granulobacter saccharobutyricum*. Fitz kannte *Gr. butylicum* nicht.

teigen, welche, bei Zimmertemperatur angefertigt, im Brutschrank vergähren.

§ 1. EINLEITUNG. AUFSTELLUNG DER GATTUNG GRANULOBACTER.

Im Jahre 1886 entdeckte ich, dass es bestimmte Getreidemehl- und Gerstenmalz-Varietäten gibt, welche, wenn dieselben mit kochendem Wasser eingemaischt werden, nach 24-stündiger Aufbewahrung bei Bruttemperatur, unter reichlicher Wasserstoff- und Kohlensäure-production in eine reine Butylalkoholgährung gerathen. Aus anderen Mehlmustern entsteht bei gleicher Behandelung, neben den genannten Gasen und sehr wenig Butylalkohol, der Hauptsache nach Buttersäure [1]).

Das Verfahren des Einmaischens bezweckt im vorliegenden Falle Abtödtung der Milchsäurebacterien, Vertreibung der Luft aus der Mehlmasse, und Verkleisterung der Stärke, alles durch Einwirkung des kochenden Wassers. Die Sporen des Butylfermentes, der Heubacillen und der Buttersäurebacterie überleben das Kochen, wenn es vorsichtig geschieht, einige Secunden, und weil daraus obligat-anaërobe Bacterien entstehen, findet die Entwickelung zunächst in der Tiefe des Mehlbreies statt. Hier erzeugen die Bacterien sehr viel Amylase [2]), wodurch die verkleisterte Stärke verflüssigt wird und in Maltose [3]) übergeht.

Auf die mit der Luft in Berührung stehende Oberfläche der Maische bildet sich gewöhnlich eine „Heubacillendecke'', welche übrigens nicht schadet, die Luft gut abschliesst und so die darunter stattfindende Gährung begünstigt.

Ich habe mich seit dem genannten Jahre vielfach mit diesem merkwürdigen Vorgange beschäftigt, und die Hauptfactoren worauf der Versuch beruht, derweise zu beherrschen gelernt, dass die Zahl

---

[1]) Ich habe bei sehr zahlreichen Gasanalysen bei diesen beiden Gährungen niemals eine Spur Methan oder irgend ein anderes Gas wie Wasserstof und Kohlensäure gefunden. Natronlange und Palladiummohr absorbiren die Gährungsgase vollständig.

[2]) Das Wort „AMYLASE" gebrauche ich, nach dem Beispiele der Franzosen, als Gattungsnamen für die verschiedenen Stärke spaltenden (amylolytisch wirkenden) Enzyme. Die folgenden „Amylasearten" habe ich genauer kennen gelernt. I. MALTASE, II. DEXTRINASE, (welche beide zusammen die „Malzdiastase" darstellen; III. PTYALIN (und PANCREASDIASTASE); IV. DIASTASE in engerem Sinne (wozu Maismalzdiastase, Butyldiastase, Buchweizendiastase, Nyctagineendiastase); V. GLUKASE.

Die Worte Butyldiastase, Butylamylase, Granulobacterdiastase, welchen man fernerhin begegnen wird, erklären sich von selbst, sie bedeuten alle dasselbe durch *Granulobacter* erzeugte amylolytische Enzym.

[3]) Glukose entsteht dabei nicht.

der Getreidemehlmuster, womit derselbe gelungen ist, sich allmählich ausgedehnt hat.

Gute Gährungen habe ich, wenn auch nur ausnahmsweise, mit Roggen-, Weizen-, Spelz- und Gerstenmehl bekommen, doch ist die Ausbeute an Butylalkohol dabei ausserordentlich verschieden, abhängig von den jemals dabei thätigen Bacterienvarietäten und Arten. Meistens findet sich in solchem Mehl soviel Buttersäureferment, dass die Butylbacterie dadurch verdrungen wird. Weitaus am Besten komme ich aus mit, in einem Garten zu Delft cultivirten, nackten Sommer-Gerstenarten *(Hordeum distichon nudum* und *H. vulgare himalayense)* [1]), worauf das Buttersäureferment gänzlich oder beinahe gänzlich zu fehlen scheint. Darauf folgt Spelz oder Dinkel, dann Roggen und endlich gewöhnlicher Weizen und Gerste, auf welchen Getreiden das Buttersäureferment in der angegebenen Reihenfolge mehr und mehr angehäuft vorzukommen scheint. Selbst mit reinem Weizenmehl, in dem Laden gekauft, sind einzelne Versuche gut gelungen.

Es dürfte nicht überflüssig sein hier die Frage nach dem Ursprunge des auf den genannten Getreidearten vorkommenden Butylfermentes kurz zu berühren, wenn ich auch nicht imstande bin dieselbe endgültig zu entscheiden. Wenn dasselbe auf die Aehre als Luftstaub angelangt, so erhebt sich die Frage, woher dann dieser Staub kommt? Da sich im Boden das Buttersäureferment, *Granulobacter saccharobutyricum*, ausserordentlich reichlich vorfindet, liegt es zwar auf der Hand an den Boden zu denken, als ursprüngliche Fundstelle auch des Butylfermentes. Wesshalb findet Letzteres sich dann aber so oft auf der nackten Gerste, ohne mit dem Buttersäureferment gemischt vorzukommen, während bei den, im nämlichen Garten gezüchteten gewöhnlichen Gerste-, Roggen- und Weizenvarietäten auf der Körneroberfläche immer *Gr. saccharobutyricum* sich in Mehrzahl vorfindet, sodass damit nur selten Butylgährungen zu erhalten sind? Ich vermag diese Frage nicht sicher zu beantworten. Ob *Gr. saccharobutyricum* vielleicht, unter irgend eine unbekannte Beeinflussung, in *Gr. butylicum* übergehen kann, das muss ich dahingestellt bleiben lassen. Im Laboratorium findet diese Umwandlung nicht statt; wohl aber bemerkt man bisweilen, dass ein gut aufbewahrtes Muster nackter Gerste, welches im Anfange nach der Ernte Butylgährung zu geben vermag, im Winter diese Eigenschaft verliert und dann nur *Gr. saccharobutyricum* zur Entwickelung bringen lässt. Bei diesem

---

[1]) Meine Erfahrung läuft über Material, geerntet in den Jahren 1887, 88, 89, 90, 91 und 92.

Thatbestande habe ich mich die Frage vorgelegt ob *Gr. butylicum* vielleicht als Parasit im Inneren der Getreidekörner lebt und leicht mit dem Mehle abstirbt. Allein es ergiebt sich, dass das nicht der Fall its; die Sporen liegen, ohne jeden Zweifel, nur auf der Aussenseite der Körner [1]). Warum das Butylferment die nackte Gerste so sehr bevorzugt bleibt also noch unklar.

Mit Reis, Mais, Buchweizen, Johannisbrod (Schoten von *Caratonia siliqua*) und Sorgho habe ich niemals kräftige Butylgährungen erhalten können, diese Materialien gerathen nämlich immer in Buttersäuregährung. Da das Butylferment darin jedoch nicht fehlt, muss die Erklärung der Erscheinung in deren chemischen Beschaffenheit gesucht werden, und zwar, wie ich glaube, in der Gegenwart von Glukose, welche im Johannisbrod fertig vorkommt und aus Reis, Mais, Buchweizen und Sorgho, welche viel von dem Enzym Glukase enthalten, leicht aus der Stärke entsteht. Dieser Zucker nun, ist sehr geeignet um in Buttersäure überzugehen, schwieriger aber in Butylalkohol.

Für das Gelingen der Butylgährungsversuche mit Roggen-, Weizen-, Spelz- und Gerstenmehl ist das genaue Einhalten gewisser Temperaturen durchaus nothwendig, nicht nur beim Einmaischen, sondern auch im Brutschrank. Ein Temperaturwechsel von 5^0 C. im Letzteren kann Veranlassung zu Buttersäurebildung geben, und so den Versuch verderben. Dieses Verhalten muss wohl darauf beruhen, dass auf der Oberfläche der Körner dieser Getreidearten die Sporen des Buttersäurefermentes in sehr reichlicher Anzahl neben denjenigen der Butylbacterie vorkommen, und dass das Temperaturoptimum für erstere Art etwas niedriger gelegen ist, wie für letztere, sodass leicht eine Verdrängung stattfinden kann. Jedenfalls ist es mir gelungen die zwei Formen, durch die Gelatinemethode, aus einer *Maische* zu isoliren, sodass ich mich berechtigt glaube anzunehmen sie kommen schon auf den Getreidekörnern vor.

Die hier zu berücksichtigenden Bacterien sind noch nicht genügend unterschieden; sie haben bisher unter die Namen *Bacillus Amylobacter* und *Clostridium butyricum* gegangen. Ich glaube aber, dass der Augenblick gekommen ist diesen Sammelnamen aufzugeben und

---

[1]) Solche Fragen sind viel leichter zu beantworten als wie gewöhnlich angenommen wird. Man bringe dazu nur die Körner, oder Theile derselben, in Mühlengaze, oder auf irgend eine andere Weise eingeschlossen, in die richtig angestellten Gährungen oder Ansätze und untersuche später die davon angefertigten mikroskopischen Präparaten auf Bacterien: niemals wird man diese innerhalb der Gewebemassen, geschweige innerhalb geschlossener Zellen finden. *Granulobacter* dringt also nicht in unverletzte Zellen hinein.

dafür einige neue Arten aufzustellen [1]). Ich selber habe Gelegenheit gehabt, ausser den zwei schon angedeuteten, sammt deren Varietäten, noch eine dritte oft und in reichem Materiale untersuchen zu können, ich meine das Buttersäureferment des Calciumlactates. Alle drei haben mit einander gemeinsam, dass sie bei Gegenwart von viel Sauerstoff überhaupt nicht wachsen, dass wenn nur Spuren von Sauerstoff in den Gährmedien vorhanden sind, schnell bewegliche Stäbchen entstehen, welche sich mit Jod gelb färben und stürmisch Wasserstoff und Kohlensäure erzeugen. Bei vollständiger Anaërobiose füllt sich ein bestimmter Körpertheil vieler Stäbchen mit Granulose, welche sich mit Jod blau färbt; hierbei schwellen die Stäbchen stark an und verwandeln sich in Clostridiën. Aus letzterem Grunde schlage ich vor die Gesammtheit der Formen weiterhin unter den Gattungsnamen *Granulobacter* zusammen zu fassen.

Zu dieser Gattung glaube ich dann auch noch eine aërobe (temporär anaërobe) Art bringen zu müssen, welche bisher unter dem Namen *Bacillus Polymyxa* bekannt war, und welche ich ebenfalls ausführlich studirt haben. Die Uebersicht der vier genauer von mir untersuchten Formen ist dann wie folgt.

Granulobacter. Obligat- oder temporär anaërobe Gährungsbacteriën [2]), welche bei vollständiger Anaërobiose sich theilweise oder ganz mit Granulose anfüllen und dann Clostridiumform annehmen. Bei Gegenwart von Sauerstoffspuren entstehen schnellbewegliche Stäbchen, welche mit Jod gelb werden. Sporen entstehen in den Clostridien, und können einige Secunden oder Minuten auf 95° C. bis 100° C. in den Nährflüssigkeiten erhitzt werden, wodurch die Entfernung von verunreinigden Bacterien möglich ist. Unter den Gährungsproducten finden sich immer Kohlensäure und gewöhnlich auch Wasserstoff, während Methan vollständig fehlt.

Die vier Hauptarten sind die folgenden.

Erstens: *Granulobacter butylicum* [3]).

Ist das Butylferment vieler Getreidemehlvarietäten. Besonders häufig auf nackter Gerste. Erzeugt aus Maltose normalen Butylalkohol, Wasserstoff und Kohlensäure, jedoch keine Buttersäure; nur anaërobie. Während der Gährung entsteht viel Diastase, welche einheitlich ist, und auch kein Glukase enthält. Sporen gross. Clostridien dick und

---

[1]) Wie das schon andeutungsweise von M. GRUBER geschehen ist, welcher *Clostridium butyricum* (*Bacillus Amylobacter*) in drei Arten spaltet, welche er kurz beschreibt als I, II, III. Bacteriologisches Centralblatt, Bd. I, pag. 370, 1887.

[2]) Für die Erklärung des Ausdruckes "temporär anaërobie" verweise ich auf § 12.

[3]) Vielleicht identisch mit GRUBER's *Bacillus Amylobacter* I, (vergl. Note 1).

kurz. Die Kolonien in Malzwürzegelatine sind milchweiss, zähschleimig, verflüssigen nicht.

Zweitens: *Granulobacter saccharobutyricum* [1]).

Das echte Buttersäureferment des Zuckers. Kommt stets vor auf Getreidemehl und in Erde von Gartenboden, und ist auch in Grabenschlamm sehr allgemein; ist das anaërobe Ferment der gewöhnlichen Buttersäuregährung aus Glukose, und schwieriger, aus Maltose. Erzeugt neben Gährungsbuttersäure, in welchselender Menge normalen Butylalkohol sowie Kohlensäure und Wasserstoff. Während der Gährung entsteht Diastase. Stimmt nahe mit voriger Art überein, sodass mikroskopische Unterscheidung nicht immer gelingt. Die Clostridien sind aber gewöhnlich schmaler, die Sporen kleiner, das Granuloseorgan ebenfalls kleiner, wie bei voriger Art. Die Kolonien wachsen in Malzwürzegelatine langsamer und bleiben kleiner und sie werden auch nicht so zähe, wie bei *G. butylicum.* Verflüssigt die Gelatine nicht.

Drittens: *Granulobacter lactobutyricum* [2]).

Ist das Buttersäureferment des Calciumlactates und erzeugt daraus, als anaërobe Clostridiumform, Calciumbutyrat, Wasserstof und Kohlensäure mit unbekannten Nebenproducten, allein kein Methan. Verliert sehr leicht die Gährkraft und wird dann zu einer Stäbchenbacterie, welche *Bacillus subtilis* ähnelt, jedoch anfangs Calciumlactat energisch zersetzt unter Bildung von Calciumcarbonat ohne Buttersäurebildung. Diese aërobe Form verflüssigt die Gelatine schwach, verwandelt sich nicht in die vorigen Arten und wächst überhaupt nicht in deren Nährlösungen. Die Clostridien sind gewöhnlich sehr kurz und dick, nicht schnell sondern nur langsam beweglich, die darin enthaltenen Sporen sind klein, mehr rund als wie beim Butylferment. Die Granulose färbt sich mit Jod nicht rein blau sondern violetblau. Die aërobe Form enthält in Reihen angeordneten Sporen, keine Granulose und wird mit Jod gelblich. Das dadurch aus dem Lactat erzeugte Calciumcarbonat besteht aus grossen interessanten Spheriten. Nach einigen Ueberimpfungen hört das Wachsthum, bei Luftzutrit, gänzlich auf. Auch die anaërobe Form veranlasst nur einzelne Gährungen um dann, bei fortgesetzter Ueberimpfung, ohne bekannten Grund, einzugehen. Kommt vor in den spontanen Buttersäuregährungen des Calciumlactates.

---

[1]) Ist identisch mit *Bacillus butylicus* Fitz, Berichte d.D. chem. Gesellschaft, Jahrg. 15, pag. 867, 1882. A. de Bary gibt davon eine gute Abbildung unter *Bacillus Amylobacter* in Vorlesungen über Bacterien, 1te Aufl., pag. 79, 1885.

[2]) Pasteur, Études sur la bière, p. 282, 1876.

Viertens: *Granulobacter Polymyxa* [1]).

Temporär-anaërobe Gährungsbacterie von Malzwürze; wächst bei vollständigen Luftzutritt am Besten, gährt jedoch nur bei beschränkter Lüftung. *Luftform* nur bewegliche Stabchen, *Gährform* Clostridien mit wenig Granulose und meistens mit Sporen. Erzeugt einen weichen voluminösen Schleim. Bei der Gährung entsteht nur Kohlensäure, kein Wasserstoff, Butylalkol nur spurenweise und keine Buttersäure. Verflüssigt die Nährgelatine langsam, jedoch vollständig. Erzeugt etwas Diastase. Ist ein constanter Bewohner der Butylansätze und desshalb sicher auf Getreidekörnern heimisch. Bildet den Uebergangsschritt van *Granulobacter* zu den „Heubacillen."

Mit diesen vier Arten ist die Reihe der Granulobacterien nicht erschöpft, mir sind wenigstens noch zwei Arten vorgekommen, welche ich noch nicht in Cultur zu bringen vermochte, wovon die eine in Grabenmoder, die andere auf Getreidekörnern. Auch halte ich er für wahrscheinlich, dass *Leptothrix buccalis*, aus dem Zahnschleime, zu *Granulobacter* gebracht werden muss.

Im Staube orientalischer Getreide finden sich übrigens sehr merkwürdige Sporen erzeugende Nebenarten zu *Gr. Polymyxa*, eine davon wächst aërobie, bildet sehr zähe Zoogloeen und enthält Glycogen anstatt Granulose.

Im zukünftigen natürlichen Systeme wird *Granulobacter*, wie schon augedeutet, seine Stellung in der Nachbarschaft von der ziemlich umfangreichen Gruppe der sogenannten Heu- und Kartoffelbacillen finden.

Andererseits dürfte *Granulobacter* systematisch zusammen hängen mit BIENSTOCK's Bacterie der Darmfäulniss, *Bacillus putrefaciens coli*, sowie mit den übrigen Sporen erzeugenden Fäulnissbacteriën der Eiweisskörper. *Granulobacter* dürfte den amhöchsten differenzirten Typus des Bacteriensystems vergegenwärtigen.

Wie schon früher gesagt ist *Granulobacter butylicum* eine Art, welche jedenfalls mehrere nahe verwandte Formenvarietäten enthält, was ebenfalls gilt für *Gr. saccharobutyricum.* Die Existenz dieser Varietäten, welche oft eine Zwischenstellung zwischen den zwei Arten einnehmen, erschwert sowohl die Untersuchung der Letzteren, wie die richtige Auffassung und Beschreibung der dadurch verursachten Erscheinungen. Ich habe mich darum entschlossen mich in dieser Mittheilung zunächst nur mit dem scharf zu characterisirenden

---

[1]) PRAZMOWSKI, Entwickelung und Fermentwirkung einiger Bacterien, pag. 37, Leipzig 1880.

Butylfermente zu beschäftigen, obschon *Gr. saccharobutyricum* allgemeiner verbreitet ist, in den Getreidemaischen *Gr. butylicum* leicht verdrängt, und dadurch in praktischer Beziehung wichtiger ist. Der Antagonismus zwischen den beiden Fermenten beruht zunächst auf die Leichtigkeit, womit *Gr. saccharobutyricum* aus Glukose Buttersäure erzeugt, welche für das Butylferment verderblich ist. Die Glukose haltigen Maischen von Mais, Sorgho, Reis und Buchweizen sind dadurch ausgezeichnet für *G. saccharobutyricum*, nicht jedoch für *G. butylicum* geeignet.

Auch das Johannisbrod enthält die Sporen beider Fermente, wird aber in den chemischen Handbüchern für Buttersäurebereitung empfohlen. Die Erklärung liegt, wie wir gesehen, im hohen Glukosegehalt des Johannisbrodes, woraus *Gr. saccharobutyricum* Säure erzeugt, welche das Wachsthum von *G. butylicum* hemmt.

§ 2. Der Butylansatz.

In der Presshefe-Industrie wird die zu vergährende Maische nicht direct mit Presshefe angestellt, sondern mit sogenanntem „Hefeansatz" oder „Kunsthefe." Man versteht darunter ein sehr consistenter dicker Malz-Roggen-Mehlbrei, welcher, nach Verzuckerung bei Diastasetemperatur, in spontane Milchsäuregährung kommt, wodurch das sogenannte „Sauergut" oder „Hefegut" entsteht, welches dann mit Hefe beschickt, nach der Gährung die „Kunsthefe" liefert. Die Hefe gährt in dem Sauergute gänzlich anaërobie und reinigt sich dadurch, während der Vergährung, beinahe vollständig von aëroben und halbaëroben Mikrobien [1]).

Mein Butylansatz hat einen ähnlichen Zweck, nur brauche ich nicht vorher zu verzuckeren, weil das Butylferment selber Diastase erzeugt, und auch brauche ich keine Butylbacterien hinzuzufügen, weil diese schon auf dem Getreide vorkommen, während echte Hefe darauf fehlt. Eigentlich sollte darum, für den richtigen Vergleich, der Butylansatz mit der spontan versäuerten Malz-Roggen-Maische, das heisst mit dem „Sauergute" verglichen werden.

Zur Herstellung des Butylansatzes bringe ich 50 bis 100 cM^3 destillirtes Wasser in ein hohes und schmales Becherglas auf dem Sandbade in lebhaftes Kochen, und setze dieses so lange fort bis die gelöste Luft gänzlich entfernt ist. Dann gebe ich mit einem

---

[1]) In historisch-industrieller Beziehung hat die „Kunsthefe" sich wohl zweifellos aus dem „Sauerteige" oder dem französischen „Levain" entwickelt, welches sich dadurch vom „Sauergute" unterscheidet, dass es Hefe enthält, während das Letztere Hefe-frei ist.

Löffel allmählich so viel grob gemahlenes, nicht gesiebtes Getreidemehl von nackter Gerste hinzu bis die Masse dickbreiig ist und die Löffel aufrecht darin stehen bleibt; zu dick soll der Brei jedoch nicht sein, weil dann die spärlichen Butylbacterien zu lange wachsen und Amylase erzeugen müssen ehe sie sich genügend durch die Masse verbreitet haben um diese überall in Gährung zu versetzen. Es wird dafür gesorgt, dass das Kochen während des Versuches nur sehr gelinde ist, sodass das zuletzt durchgemischtes Mehl nur einige Secunden auf 100° C. verweilt. Dann wird das Gläschen mit einer Glasplatte überdeckt und sofort in einen Thermostaten bei 35 à 37° C. gestellt. Hier findet das Abkühlen sehr langsam statt, und wenn man das Glas nach 12 Stunden genau beobachtet, so findet man schon einige Gasblasen als Zeichen der anfangenden Gährung, schon nach 24 Stunden kann die Gährung lebhaft sein und nach 36 Stunden ist der etwas betäubende, jedoch nicht unangenehme Geruch des Butylalkohols bemerkbar, welcher dann weiterhin noch einige Tage stärker wird. Hat man ein glückliches Getreidemuster getroffen, wie ich das im frischen Mehle der nackten Gerste meistens (nicht immer) vorfinde, so erhält man oft sofort eine wahrhafte Reingährung, denn selbst die Heupilze können dabei gänzlich in ihrer Entwickelung unterdrückt werden oder fehlen. Bei gewissen, sehr seltenen Mustern ist man auch in Bezug auf die Temperatur viel freier. So habe ich im Jahre 1887 eine zweizeilige Gerste geerntet, welche für die Butylgährung so geeignet war, dass ich nur das Mehl davon mit Wasser von 60° C. zu mischen hatte um eine tadellose Reingährung zu erhalten [1]). Mit allen anderen Mustern späterer Jahre erhielt ich bei 60° C. nur Säurebildung, welche für die Butylgährung verderblich ist und sehr bald das Wachsthum der Butylbacterien hemmte. In den gewöhnlichen Fällen muss man darum beim Siedepunkt arbeiten, welches, wenigstens für die Milchsäurefermente tödlich ist.

Ich habe mich das eigenthümliche Verhalten jener seltenen Getreidemuster, wobei das Kochen des Ansatzes überflüssig war, nicht anders als dadurch erklären können, dass ich annehme, es fände sich darauf eine besonders kräftige Varietät der Butylbacterie. [2]) Dazu

---

[1]) Die Butylbacterien können Spuren Sauerstoff verzehren; bei dem beschriebenen Versuche werden sie dabei aber geholfen durch die anfangs sich entwickelenden bald, verschwindenden Heubacterien.

[2]) Anzunehmen Säuerefermente sollen auf dem Muster zufälligeweise gefehlt haben wäre unstatthaft, sowohl wegen der inneren Unwahrscheinlichkeit, wie angesichts der gleichfolgend beschriebenen Erfahrung.

fand ich auch Veranlassung in den folgenden Umständen. Wie wir sehen werden habe ich ein Verfahren um die Butylbacterien gesondert zu gewinnen; sie werden dann getrocknet und die Stücke entweder als solche aufbewahrt oder zuvor im Mörser pulverisirt. Ich habe dieses vielfach gethan und mich durchaus keine Mühe gegeben dabei die Verbreitung des Bacterienstaubes in die Laboratoriumluft vorzubeugen. Nun hat sich ergeben, dass dieser, in der Luft schwebende Staub, im Jahre 1887 im Stande gewesen ist gewöhnliche, mit PASTEUR's Glasverschluss geschlossene Kölbchen mit Malzwürze, welche mit anderen Bacterienarten beschickt und dadurch luftfrei geworden waren, beim Oeffnen spontan zu infiziren, und in unvollkommene Butylgährung zu versetzen. Auch bei Laevulose-Stärke-Gelatine, welche ich damals für Versuche über Sauerstoffbildung durch Chlorellen verwendete, wofür ich die mit *Chlorella* und *Mycoderma* infizirte Gelatine zwischen zwei parallelen Fensterglasscheiben eingeschlossen hatte, welche eine Glaskammer bildeten, die für Luftabschluss allseitig paraffinirt war, auch in dieser Masse habe ich dann höchst merkwürdige spontane Butylinfection beobachtet, welche ich in späteren Jahren, selbst bei absichtlichen Versuchen, nicht herstellen konnte. Ich habe noch stets trockne Butylbacterien von jenem Jahrgange in Vorrath (vergl. § 8) und ich kann dieselben auch wieder beleben und für neue Gährungen verwenden, doch ist ihre ausserordentliche Vegetationskraft, oder, wenn ich so sagen darf ihre Virulenz, verschwunden, und dieselben verhalten sich nur, wie das gewöhnliche spontane Material [1]). Solche besonders vegetationskräftige Bacterien scheinen zu den seltensten Ausnahmen zu gehören, und ich wiederhole meine fruhere Bemerkung, dass, wenn diese nicht vorliegen, der Butylansatz eine sehr genaue Ueberwachtung der Temperatur erfordert um nicht in Buttersäurebildung zu gerathen. Nur dann, wenn das Butylferment nur mit *Granulobacter Polymyxa* und *Bacillus subtilis* auf dem Getreide vorkommt, ist, bei der Herstellung des Ansatzes, jede Temperatur oberhalb 60° C. zureichend um das Butylferment in Reincultur zu erhalten. Ob ein gegebener Ansatz sich für weitere Gährungsversuche eignen wird, beurtheile ich an die Quantität der flüchtigen Säure, welche sich während des Versuches im Condensationswasser, das sich auf der Deckplatte des Becherglases absetzt, vorfindet. Je weniger sauer dieses Wasser reagirt, desto sicherer ist man wenig Buttersäureferment oder eine kräftige

---

[1]) Ich bewahre die Butylbacterien in kleinen Stöpselfläschen mit Glasstöpsel. Es ergibt sich, dass grosse trockene Stücke der Bacterienmasse länger lebend bleiben als fein pulverisirtes Material.

Varietät der Butylbacterie vor sich zu haben. Bemerkt man, dass in einem Butylansatze, welcher durch Säurebildung geschädigt ist mikroskopisch Butylclostridien mit Sporen nachweisbar sind, so kann man, wenn nicht zu gleicher Zeit zu viel Sporen des *Gr. saccharobutyricum* vorhanden sind, durch erneutes Aufkochen des Ansatzes *während einiger Secunden*, die Säure bildenden Bacterien tödten und das Butylferment und damit die normale Butylgährung regeneriren.

Das mikroskopische Bild der Butylansätze is verschieden je nach den darin vorkommenden Varietäten des Butylfermentes. In Fig. 5 sieht man den Zustand einer guten Gährung in Mehl von nackter Gerste, wobei, um das Bild nicht zu trüben, nur die Bacterien und nicht die Trebertheilchen gezeichnet sind. Das Präparat, welches diesem Bilde zu Grunde lag, war demjenigen Stadium entnommen, wo der Sauerstoff vollständig verzehrt war; Clostridien führen darin die Hauptrolle.

Anders jedoch beim ersten Beginn des Wachtsthums, so lange noch Spuren von Sauerstoff da sind. In diesem Anfangsstadium findet man nur die Sauerstoffform des Butylfermentes, welches Stäbchenform besitzt (Fig. 4), und Uebung erfordert um von anderen besonders von den Buttersäurebacterien unterschieden zu werden. Doch besitzt das Ferment auch dann schon etwas Characteristisches, die Stäbchen sind nämlich kürzer und viel deutlicher an den Enden abgerundet wie bei *G. saccharobutyricum*.

Bei richtiger Butylgährung werden die Stäbchen des Anfangsstadiums sehr bald durch Clostridien mit Sporen ersetzt, während das, durch die Letzteren characterisirte Höhenstadium bei der Buttersäuregährung viel länger ausbleibt. Je kürzer und dicker die Clostridien und je grösser und länger die Sporen, desto kräftiger ist die Butylalkoholerzeugung; sind die Sporen gänzlich rund so hat man eine geschwächte Form des Butylfermentes vor sich.

§ 3. Die Gährungsflüssigkeit.

Der in Butylgährung stehende Ansatz ist viel zu sehr verunreinigt mit Trebern um für eine weitere chemische Erforschung des Vorganges dienen zu können. Wenn man aber weiss, dass die Ernährungsbedingungen der Butylbacterie nahe übereinstimmen mit denjenigen der Alkoholhefe, so kann es nicht wundernehmen, dass in der Würze der Malz-Roggen-Maische der Presshefefabriken[1]) eine

[1]) Diese Würze ist nahezu neutral und kann 20 Saccharometergrade anweisen. Sie wird nicht als solche für die Hefeindustrie verwendet, sondern gemeinschaftlich mit den Trebern und nach Vermischung und Verdünnung mit Schlempe bis s^0 10.

ausgezeichnete Butylgährungsflüssigkeit vorliegt. Diese muss aber durch verdünnen auf ca. 10 Saccharometergrade gebracht werden, denn schon bei s^0 12 wird die Gährung sehr wesentlich gehemmt. Wenn wir hier die Butyl- mit der Alkoholgährung vergleichen, so muss nicht vergessen werden, dass dieser Vergleich nur für die chemischen Ernährungsbedingungen der dabei thätigen Fermente zutrift, und, dass in anderen sehr wichtigen Beziehungen durchgreifende Gegensätze zwischen denselben bestehen. Besonders will ich hier betonen, dass die Alkoholhefe nur während sehr kurzer Zeit ohne Luft gähren kann, weil die, in den Zellen gebunden vorkommende Sauerstoffreserve nur für die Erzeugung dreier Zellgenerationen ausreicht, und dann von aussen erneuert werden muss, während die Butylbacterie vollständig anaërobie ist und eben durch Sauerstoffzutritt aufhört zu wachsen und zu gähren.

Es sei ferner hervorgehoben, dass das Temperaturoptimum für die Alkoholgährung (der Brennereien und Hefefabriken) ungefähr bei 30° C., für die Butylgährung bei ca. 37° C. liegt, und, schliesslich, dass die Butylbacterien sehr empfindlich für Säure sind, sodass 2 bis 3 cM^3 Normalsäure pro 100 cM^3 Gährflüssigkeit, die Butylgährung schon aufhebt, während die nämliche Flüssigkeit selbst mit 6 bis 10 cM^3 Normalmilchsäure, oder Normalweinsäure, noch gut alkoholisch vergähren und viel Hefe produziren kann[1]). Höchstens 1 bis 2 cM^3 Normalsäure pro 100 cM^3, kann also bei übrigens guten Bedingungen noch eben durch das Butylferment ertragen werden. Für die Butylgährung ist es desshalb wichtig die Würze zu neutralisiren, wenn schon eine schwache Milchsäuregährung bei deren Herstellung eingetreten war, was besonders bei Versuchen im Grossen leicht geschieht, da die ungehopfte Würze ausserordentlich leicht säuert. Ich habe das Neutralisieren früher mit Kreide in Uebermaass vorgenommen, welche schon bei dem Kochen hinzugefügt wurde. Seitdem ich aber weiss dass *Granulobacter butylicum* aus Maltose überhaupt keine Buttersäure erzeugt, und nur sehr geringe Spuren anderer Säuren, welche die Gährung nicht beeinträchtigen, neutralisire ich anfangs nur mit ein wenig Natriumcarbonat oder überhaupt nicht. Während *Granulobacter butylicum* aus Maltose, wie gesagt, keine Säure erzeugt,

---

[1]) Unter sehr günstigen Ernährungsbedingungen, in dicken Malzmaischen, habe ich bei der Alkoholgährung mit Presshefe einen normalen Verlauf beobachtet bei nicht weniger als 25 cM^3 Normalmilchsäure pro 100 cM^3 Maische! Es hatten dabei zwei bis drei Zelltheilungen stattgefunden, die erzeugte Gährungswärme war normal und das Alkoholrendement ebenfalls normal. Sobald die Maischen aber wenig Treber enthalten wirkt 12 cM^3 Normalmilchsäure schon beeinträchtigend auf das Wachsthum.

dürfte dieses unter Umständen aus Glukose in verschiedenen Intensitätsgraden stattfinden, und zwar derweise, dass die kräftigeren Butylbacterienvarietäten aus Glukose nur Butylalkohol und keine Säure, die minder kräftigen dagegen neben Alkohol auch etwas Buttersäure erzeugen. Die Letzteren bilden dadurch den Uebergang zu *Gr. saccharobutyricum*, wovon sie auch in anderen Hinsichten nicht immer sicher zu unterscheiden sind. Unter solchen Umständen ist das Neutralisiren mit viel Kreide vorzuziehen.

Was nun *Granulobacter saccharobutyricum* für sich anbelangt, diese Bacterie produzirt aus Glukose neben wenig Butylalkohol sehr viel Buttersäure, und zwar nicht allein aus Glukose sondern auch aus Maltose. Die Säure beeinträchtigt die Zoögloeabildung, während die Gasproduction sehr intensiv verbleibt. Befindet sich in der Gährungflüssigkeit viel Glukose so wird, wie sich aus den genannten Umständen erwarten liess, der normale Verlauf der Gährung, wenn viel *Gr. saccharobutyricum* neben *Gr. butylicum* gegenwärtig ist, vollständig abgeändert, was noch einmal betont sei. Ich wünsche desshalb besonder zu erwähnen, dass hier nur von den Glukose armen Gährflüssigkeiten gehandelt werden wird, wie sie beim industriellen Maischverfahren angefertigt werden, und dass ich als Infectionsmaterial nur *Gr. butylicum* entweder rein oder nur unbedeutend verunreinigt durch Buttersäureferment, voraussetze.

§ 4. Reincultur des Butylfermentes in Nährgelatine. Methodisches.

Für die Reincultur des Butylfermentes in geeigneter Nährgelatine ist es nöthig bei vollständigem Luftabschluss zu experimentiren. Selbst die „Sauerstoffform" des Fermentes, die wir später noch näher werden kennen lernen, entwickelt sich bei Sauerstoffspannungen, welche so gering sind, dass die chemischen Sauerstoffbestimmungsmethoden im Stiche lassen [1]). Nur mit Hülfe des Lichtbacterienverfahrens konnte ich, in die hier zu berücksichtigenden Flüssig-

[1]) Für den Sauerstoffnachweis, bei Gegenwart von viel organischem Stoff, wie in Würze, giebt es besonders zwei Verfahren, welche auch, wenn es sich um die quantiattive Bestimmung handelt, zum Zwecke führen können, nämlich Schützenberger's Hydrosulfitverfahren mit Indigschwefelsaures-Natrium als Indicator (Schützenberger, Les Fermentations, 4me Ed. pag. 92, 1884), und das Lichtbacterienverfahren. Handelt es sich um den quantitativen Sauerstoffnachweis im Trinkwasser oder, im Allgemeinen, in Flüssigkeiten, welche arm sind an organischen Körpern, so sind die jodometrische Methode von Winkler (Berichte d. D. chem. Gesellschaft, Jahrg. 21, pag. 2843, 1888) und die von A. Lévy abgeänderte Permanganatmethode (Annuaire de l'Observatoire municipal de Montsouris 1892—93 pag. 233), wegen ihrer Einfachkeit vorzuziehen.

keiten noch die Gegenwart von Sauerstoffspuren anzeigen, sodass der physiologische Versuch hier, wie in so manchen anderen Fällen, den chemischen an Genauigkeit, und gewissermaassen auch an Einfachkeit übertrifft [1]).

Da eine mässig concentrirte Malzwürze das beste Nährmittel für das Butylferment ist, kommt es für unseren gegenwärtigen Zweck, darauf an eine vollständig sauerstofffreie Würzegelatine darzustellen, und die darin gebrachte Aussaat für Luftzutritt zu schützen. Von den verschiedenen, für anaërobe Reincultur empfohlenen Methoden [2]), habe ich die meisten für Isolirung des Butylfermentes nachgeprüft, und auch habe ich selber einige besondere Einrichtungen zu diesem Zwecke ausgedacht. Die Zeit, welche die Einrichtung der Versuche fordert, ist bei den verschiedenen Methoden nicht sehr verschieden. Wohl dagegen die Leichtigkeit womit die Kolonien bei den verschiedenen Versuchseinrichtungen für mikroskopische und anderweitige Untersuchung erreichbar sind. Ich habe es als wichtig betrachtet die Butylkolonien auf Gelatinplatten zu cultiviren, welche ebenso leicht, wie bei dem gewöhnlichen Plattenverfähren untersucht werden können, und also erlauben eine und dieselbe Kolonie Tage lang während des Wachsthums zu verfolgen, und derselben Untersuchungsmaterial zu entlehnen. Diesen Zweck habe ich am Besten wie folgt erreicht.

Wenn der Versuch anfängt wird in einem Kölbchen ca. 25 cM^3 Würze-gelatine, durch Kochen vollständig sauerstofffrei gemacht. Durch den Watteverschluss passirt ein Glasröhrchen, wodurch es möglich ist während der Abkühlung der Gelatine, vor der Infizirung, Kohlensäure in das Kölbchen hinein zu leiten. Hat man, wie gewöhnlich, sporenhaltiges Infectionsmaterial, wie z. B. einen guten Butylansatz, oder eine reife Gährung, so kann die Infizirung bei 60° C. bis 90° C. stattfinden, wobei etwaige Milchsäurefermente und die gewöhnlichen Gährungsbacterien [3]) absterben. Nach der Infizirung wird dann bis zur Erstarrungstemperatur, im Kohlensäurestrome weiter abgekühlt und dann schnell in eine gewöhnliche Glasdose oder Glasschale übergegossen, worin das Erstarren unter einem kräftigen Kohlen-

---

[1]) Eine gute Leuchtflüssigkeit, durch Quecksilber von der Luft abgeschlossen, reagirt mit einer bemerkenswerthen Empfindlichkeit auf Sauerstoffspuren, wenn das Auge, durch längeres Verweilen im Dunkelen, nur genügend empfindlich ist.

[2]) In den letzten Jahren sind deren nicht wenige empfohlen. Merkwürdigerweise beschreiben mehrere Autoren zwar das Verfahren, jedoch nicht die Bacterien, welche damit isolirt oder cultivirt worden sind.

[3]) Das heisst die reichhaltige, bisweilen in erstaunlicher Individuenmenge auf Getreiden vorkommende Formengruppe aus dem Verwandtschaftskreise des *Bacillus lactis aërogenes*, ESCHERICH.

säurestrome stattfinden muss, was einfach durch Einleiten diesesGases unter den etwas gelüfteten Deckel geschieht. Natürlich muss die Glasdose vordem durch Erhitzen auf 125° C. vollständig sterilisirt sein.

Sobald die Schicht fest ist, wird die Dose umgekehrt, und mit der Oeffnung auf eine freien Quecksilberspiegel gebracht. Der innere Raum, welcher nun ganz abgeschlossen ist, wird sofort vermittelst eines hakenförmig umgebogenen Glasröhrchens mit Wasserstoff angefüllt. Um die grosse freie Quecksilberoberfläche zu verkleineren wird darauf vorher eine runde Glasplatte gelegt, welche gut in der Dose passt und darin, mit dem Quecksilberspiegel auf- und abgehen kann.

In letzterer Glasplatte ist irgend am Rande ein kleiner Ausschnitt angebracht um das Röhrchen für die Wasserstofffüllung leichten Durchtritt zu verschaffen. Die Schale welche das Quecksilber fasst ist von Ebonit angefertigt, und ist am Aussenrande mit einem nach innen gewendeten Kragen versehen, welcher die Glasdose nahe und mit Reibung umfasst, ohne die Beweglichkeit davon gänzlich aufzuheben. Auch in diesem Kragen ist ein Ausschnitt um das Wasserstoffröhrchen hinein- und hinausführen zu können. Durch den Kragen ist das Quecksilber allseitig eingeschlossen und der ganze Apparat leicht zu handhaben, ohne fürchten zu müssen Quecksilber hinauszuwerfen bei der Bewegung.

Die fertige Vorrichtung stellt einen vollständig abgeschlossenen, wasserstoffhaltigen Raum dar. Allein der Sauerstoff ist daraus doch nicht so vollkommen entfernt, dass das Wachsthum des Butylfermentes in diesem Raume möglich wäre. Die vollständige Entfernung davon erheischt noch ein stark sauerstoffabsorbirendes Medium. Als solches verwende ich entweder eine concentrirte Lösung von SCHÜTZENBERGER's Hydrosulfit ($SO^2 Na^2$) [1], oder irgend ein anderer reducirender Stoff, wie alkalisches Pyrogallol, Ferro- oder Manganosulfat präcipitirt mit Natronlauge, oder Ferrosulfat präcipitirt mit Ferrocyankalium [2]). Diese Körper werden als Lösung oder als dicker Brei in ein Glasschälchen gefüllt, und dieses auf der Glasplatte gesetzt, welche auf dem Quecksilber treibt, und über welche die Glasdose mit nach obengekehrter Gelatinschicht gestülpt ist.

Besser aber als diese chemischen Sauerstoffabsorptionsmittel hat sich die Sauerstoffathmung gewisser Mikroben für meinem Zweck bewährt. Dabei verfahre ich wie folgt.

---

[1]) Das Salz ist käuflich von SCHUCHARDT in Görlitz zu beziehen.

[2]) Ich habe auch mit gutem Erfolge Stangenphosphor verwendet, doch wurde das Wachsthum des Butylfermentes durch die Dämpfe der phosphorigen Säure beeinträchtigt.

Anstatt das auf der treibenden Glasplatte stehende Schälchen mit einem der genannten Körper anzufüllen bringe ich darin mit Glukose versetzte Malzwürzegelatine, welche mit einer Reincultur von Kahmpilz *(Saccharomyces Mycoderma)* in reichem Maasse untermischt ist.[1]) Der Kahmpilz äbsorbirt die letzten Sauerstoffspuren begierig, und wächst auch schwach anaërobie auf Kosten der Glukose, wobei Kohlensäure und Alkohol entstehen, sodass etwas Gas aus der Dose zu entweichen sucht und ein vollständig sauerstofffreier Innenraum unterhalb der Gelatinschicht entsteht, und fortdauernd erhalten bleibt[2]).

Schimmel und andere aërobe Infectionen braucht man bei diesem Versuche nicht sehr zu fürchten, denn dieselben wachsen bei guter Ausführung überhaupt nicht. Immerhin ist es empfehlenswerth dieselben doch fern zu halten um später, wenn die Kolonien entwickelt sind, die Dosen mit ihrem gewöhnlichen Glasdeckel verschlossen, ohne Furcht fur Verderbniss, also bei Luftzutritt, bewahren zu können.

Wenn nun der fertige Apparat in einen Brutraum bei 20° C. gestellt wird, so sieht man nach fünf oder sechs Tagen (früher oder später je nachdem das Entfernen des Sauerstoffs aus der Gelatine beim Kochen besser oder weniger gut gelungen ist) die Kolonien als nicht verflüssigende weisse Schleimkügelchen entstehen.

Die Gährungenskohlensäure und der Gährungswasserstof, welche dabei gleichzeitig erzeugt werden, häufen sich bis zur Sättigung in der Gelatinschicht an und erzeugen darin, bei ihrem frei werden, nahe bei den Kolonien, die bekannten linsenförmigen Gasblasen.

Die Kolonien sind von zweierlei Natur. Sie bestehen nämlich aus Stäbchen oder Fäden ohne Sporen (Fig. 4), und aus Clostridien und Stäbchen mit Granulose und mit Sporen (Fig. 5, 6).

Die Verschiedenheit ist sehr gross doch findet man alle möglichen Uebergänge, und ein genaueres Eingehen auf die Entstehungsbedingungen lehrt, dass die Clostridiumform bei völlstandigem, die Stäbchenform bei nicht absolutem Sauerstoffabschluss entsteht.

In geeigneter Würzegelatine und bei vollständigem Sauerstoffabschluss werden die Kolonien sehr gross, sie können leicht Kugeln von fünf mM. Mittellinie bilden. Sie lassen sich mit dem Platinfaden in einem Stücke aus der Gelatine heben und ergeben sich dabei als schleimige Zoogloeen, welche aus beweglichen oder ruhenden sporenführenden oder sporenfreien Clostridien und Stäbchen bestehen, welche

---

[1]) Alkoholhefe und mehrere Bacterienarten kamen ebenfalls mit Erfolg in Verwendung.

[2]) Der kleine Apparat wird, nach meiner Anweisung, hergestellt von Herrn Mechaniker Giltay, zu Delft, Holland.

Letztere, unter sich, auch wieder bedeutend verschieden sein können. Die nur aus Stäbchen bestehenden Kolonien färben sich mit Jodlösung gelb, die aus Clostridien zusammengesetzten dagegen violet-blau bis schwarz. Soll die Reaction recht deutlich beobachtet werden so ist es geignet die Kolonie in ein Porzellanschälchen einige Zeit in der Jodlösung verweilen zu lassen, weil das Jod in die Zoogloeen nur langsam hineindringt, und dann dieselben auf weissen Untergrund zu besichtigen.

Ist die Beseitigung des Sauerstoffs nicht vollständig erreicht, jedoch genügend um Wachsthum zu ermöglichen, so entstehen, wie gesagt, Kolonien welche nur aus Stäbchen oder Fäden zusammengesetzt sind, die also als die „Sauerstoffform" des Butylfermentes bezeichnet werden müssen. Dieselben färben sich mit Jodlösung gelb und machen durchaus den Eindruck einer anderen Bacterienart. Da wir unten, bei der Hauptgährung dieser Form aufs Neue begegnen werden, können wir dieselbe einstweilen verlassen.

Dagegen will ich hier noch darauf hinweisen, dass es durch Hinzufügung von ein wenig Stärkekleister oder von löslicher Stärke an die Würzegelatine gelingt, bei meinem Versuchsverfahren die Bildung der Butyldiastase direct und höchst charakteristisch sichtbar zu machen, weil ringsum jede Kolonie ein Diastasediffusionsfeld [1]) entsteht, worin die Stärke verschwunden ist, sodass Jod dasselbe nicht färben kann. Wenn nun eine solche stärkeführende Wurzegelatinplatte, worin Butylfermentkolonien entwickelt sind, mit Jodlösung übergossen wird, so färben sich die Diastasediffusionsfelder der Butylkolonien nicht, während die Stärkegelatine an sich durch das Jod blauschwarz wird. Mit Ausnahme der Gramineenkeime, welche in Bezug auf Diastaseproduction das Höchste leisten, sind mir bisher keine Organismen bekannt geworden, welche solche ausgedehnte Amylasediffusionsfelder erzeugen, wie die Kolonien des Butylfermentes. Zwischen Sauerstoffform und Clostridiumform konnte ich, in Bezug auf die Intensität der Diastasebildung, keinen deutlichen Unterschied beobachten.

Natürlich kann eine anaërobe Cultur des Fermentes auch auf viele andere Weisen hergestellt werden. Ziemlich einfach und zweckentsprechend sind z.B. Glaskammern, welche durch einen Glasring, worauf beiderseits eine geschliffene Glasscheibe liegt, gebildet werden. Hierbei muss man jedoch Rechnung halten mit der Luftschicht, welche

---

[1]) Man findet oft angegeben, dass „Diastase" nicht diffusionsfähig sei. Das ist ein Irrthum, die verschiedenen Amylasearten diffundiren mit ungefähr derselben Schnelligkeit wie die Peptone, und passiren organische Häute mit Leichtigkeit.

den Glasplatten anhaftet und darum einen dicken Glasring verwenden, das heisst mit einer grossen und dicken Gelatinplatte, welche z. B. 50 cM^3. in 3 mM. dicker Lage misst, arbeiten. Auch müssen die Glasplatten vermittelst Schrauben auf den Ring gepresst werden da anders die Luft doch noch zutritt. Das Unvollkommene dieser Versuchsanstellung besteht darin, dass beim Oeffnen der Kammer, sobald die Kolonien untersucht werden sollen, die Gelatine zerrissen und zerrieben wird, und, wenn dann die Glasplatte wieder angepresst wird, Luftblasen und meistens auch Schimmelsporen hinzu getreten sind, so dass nach einmaliger Oeffnung der Versuch als beendet betrachtet werden muss.

Diese Uebelstände gelten ebenfalls für das allbekannte und übrigens ausgezeichnete Verfahren von LIBORIUS [1]), welcher in Nährgelatine cultivirt, die ganz einfach in Reagentienröhrchen sterilisirt, durch Kochen sauerstofffrei gemacht [2]), infizirt und erstarrt wird. In der Tiefe des Röhrchens, wo der Sauerstoff nicht hinzutreten kann, entstehen die Kolonien, welche dann durch einen Feilstrich in der Glasröhrenwand erreichbar gemacht werden. In Butylaussaaten in Würzegelatine, welche nach diesem Verfahren angefertigt sind entsteht eine Oberflächenschicht von zwei bis drei Centimeter Dicke worin, wegen Sauerstoffzutritt, keine Kolonien entstehen. Darunter in der Tiefe ist die Entwickelung jedoch gleichmässig. Die obersten Kolonien, welche jedenfalls nach ein paar Tagen Sauerstoff erhalten, welche von obenher in die Gelatine hineindiffundirt, fahren trotzdem fort zu wachsen, sodass, selbst nach Wochen, kein Grössenunterschied zwischen den Kolonien bei der Oberfläche und jenen in der Tiefe der Röhre sichtbar ist. Die Peripherie solcher Kolonien besteht aber aus der Sauerstoffform (Fig. 4), im Inneren derselben findet man dagegen die Clostridiumform (Fig. 6) des Fermentes.

Wenn ich die Methode von LIBORIUS für die Reincultur nicht in erster Linie empfehlen kann, so möchte ich hier doch nicht die Gelegenheit vorübergehen lassen um auf die Wichtigkeit dieses Verfahrens in anderer Beziehung hinzuweisen. Darüber Folgendes.

Bei guter Versuchsausführung hat man, wenn das Röhrchen, nach dem Erstarren, mit Baumwolle abgeschlossen wird, von oben nach unten in der hohen Gelatinsäule alle möglichen Sättigungsgrade der Culturgelatine mit Sauerstoff, sodass von irgend einer gegebenen Mikrobienaussaat, wenn diese nur dicht genug in der Gelatine ver-

---

[1]) Zeitschr. f. Hygiene, Bd. I, pag. 161, 1886.

[2]) Durchleiten von Wasserstoff durch die Gelatine ist nicht nothwendig, und wegen der Schaumbildung selbst zu entrathen.

theilt ist, mit einem Blicke erkannt werden kann ob facultative oder obligate Anaërobiose vorliegt, ja, unter geeigneten Ernährungsbedingungen ist selbst die tiefer verborgene temporäre Anaërobiose (wie z. B. bei der Alkoholhefe) als solche erkennbar und von der facultativen deutlich zu unterscheiden.

Hat man der Nährgelatine etwas Natriumhydrosulfit und Indig schwefelsauresnatrium zugesetzt, wodurch Indigweiss entsteht, so wird man an der Entstehung von Indigblau von oben nach unten, genau beurtheilen können bis wohin der hineindiffundirende Sauerstoff angelangt ist. Bei der Cultur des Butylfermentes wird man bemerken, das die erste Entstehung der Kolonien nur in derjenigen Region stattfindet, wo Indigweiss vorkommt. Bei diesem Versuche muss das Röhrchen im Dunkelen aufbewahrt werden, weil Indigblau durch Sauerstoff bei Lichtzutritt oxydirt und entfärbt wird, im Dunkelen dagegen durch den Sauerstoff nicht verändert.

Eine zweite bemerkenswerthe allgemeine Anwendung findet die Methode, — jedoch ebenfalls nur bei genügend dichter Aussaat, — bei der Erkennung und Feststellung der Gährfunction. Da Gährung immer von Gasbildung begleitet ist, und da die Nährgelatine das erzeugte Gas nicht entweichen lässt, zeigt die Gegenwart von Gasblasen in der Gelatine, dass Gährfunction vorliegt. Besonders das Butylferment zeigt auf diese Weise, wie gewaltig die dadurch in Würze verursachte Gasbildung ist.

Noch in einer dritten Beziehung kann das Verfahren werthvoll werden, nämlich zur Erkennung der Reductionsfunction. Man fügt der Gelatine zu diesem Zwecke einen Farbstoff zu, welcher durch Reduction ein farbloses Chromogen erzeugt. Dazu lassen sich z. B. Lakmus oder Bleu Coupier, weitaus am Besten aber Indigschwefelsauresnatrium verwenden. Das Butylferment zeigt bei diesem Versuche, dass es mit einer ganz besonders ausgeprägten Intensität reduzirt.

Wie man sieht ist das Verfahren von Liborius, wenn nicht gerade für Reincultur, doch in manchen anderen Beziehungen sehr werthvoll.

Kehren wir aber zu den durch Reincultur erhaltenen Kolonien des Butylfermentes zurück.

Ich habe mit denselben eine Reihe meiner Gährungskolben infizirt und dadurch die schönsten und productivsten Butylgährungen, ohne eine Spur von Buttersäure erhalten. Die Erscheinungen, welche dabei zu Vorschein kamen lehrten, dass der „Zustand" der Kolonien unzweifelhaft auf den Verlauf der Formenwandelungen der Butylbacterien während der Gährung, sowie auch auf die Natur der Gähr-

producte von Einfluss ist. Unter „Zustand" verstehe ich hier die mehr oder wenige vollständige Annährung der Kolonien an die „Sauerstoff"- oder an die „Clostridiumform". Wird Erstere als Aussaatsmaterial verwendet, so bleibt auch während der Hauptgährung diese Form ausserordentlich lange bemerkbar, und damit verkleinert sich das Rendement an Butylalkohol. Genau das Umgekehrte gilt in Bezug auf die Clostridiumform. Hier hat man also ein, durch einen äusseren Umstand hervorgerufenes, nur auf die Anhäufung einer Sauerstoffreserve beruhendes, morphologisches und physiologisches Merkmal, welches ein gewisses Maass von Erblichkeit besitzt.

Uebrigens ist das Hauptresultat des Studiums der Reinculturen für mich gewesen, dass ich die volle Ueberzeugung erlangt habe, mit meinen, aus nackter Gerste angefertigten Butylansätzen, genau dasselbe erreichen zu können, wie mit der Aussaat der Butylkolonien. Zu gleicher Zeit habe ich aber eine Reihe merkwürdige Bacterien isolirt, welche in den Butylgährungen leben können und dafür gleichgültig oder schädlich sind. Mit Ausnahme des Buttersäurefermentes können dieselben alle durch Wärme von dem Butylfermente getrennt werden, weil sie entweder überhaupt keine, oder schon bei 90° C. à 95° C. absterbende Sporen erzeugen.

Auch will ich hervorheben, dass, wenn ich durch die Reinculturen und deren Verwendung für die Gährung auch Nichts eigentlich Neues gelernt habe, erst dadurch jenes Gefühl wissenschaftlicher Befriedigung in mir gereift ist, welches nothwendig ist um eine Arbeit als vollendet betrachten zu können. Eines, glaube ich, musste aber ohne die Reinculturen für meine Leser zweifelhaft geblieben sein, nämlich die Zugehörigkeit der Sauerstoffform zu dem Butylfermente. Eine einzelne gelungene Gelatincultur lehrt die Beziehungen zwischen Clostridien und Stäbchen oder Fädenkolonien, durch die einfachste mikroskopische Untersuchung in allseitiger Vollendung. Hätte ich die Reinculturen nicht gründlich untersucht und vielfach verwendet, so wäre ich selbst allerdings von jener Zusammengehörigkeit nicht weniger überzeugt gewesen wie nun, doch würde ich dann vielleicht auf Widerspruch stossen, welcher nun mehr keinen Raum finden kann.

§ 5. Der Butylgährungskolben und die Hauptgährung.

Der Kolben muss in erster Linie so eingerichtet sein, dass die Luft daraus vollständig entfernt werden und die Infection ohne Luftzutritt geschehen kann. Ferner muss die Einrichtung eine derartige sein, dass das sich entwickelende Gas leicht gesammelt, und der

Inhalt fortwährend mikroskopisch untersucht werden kann, ebenfalls ohne Luft zutreten zu lassen.

Ich habe zur Erreichung dieses ziemlich complizirten Zweckes mehrere Kolbenformen blasen lassen, bin aber schliesslich bei einer sehr einfachen Einrichtung stehen geblieben, welche ich Chemikern und Physiologen, die meine Versuche wiederholen wollen, sehr besonders empfehlen kann.

Wenn es sich, wie im vorliegenden Falle, um vollständige Anaërobiose handelt, so ist es erwünscht mit nicht zu geringen Quantitäten der gährenden Flüssigkeit zu arbeiten. Zwar haben alle mir bisher bekannt gewordene Anaëroben das Vermögen die letzten Spuren Sauerstoff durch ihre eigene Lebensfunctionen zu entfernen, doch sind die Versuche am Sichersten, wenn man dieses unvermeidliche Minimum doch noch so viel möglich einschränkt. Ich arbeite desshalb mit Literkolben, welche einen sehr engen und langen Hals haben. Da meine Butylgährung gänzlich unabhängig von der Gelatinemethode ausgeführt werden kann, und desshalb voraussichtlich auch von Chemikern wiederholt werden wird, habe ich geglaubt, dass es erwünscht wäre nicht nur den Gährungskolben allein, sondern die ganze Einrichtung der Butylhauptgährung abzubilden. Dieses ist in Fig. 1 geschehen.

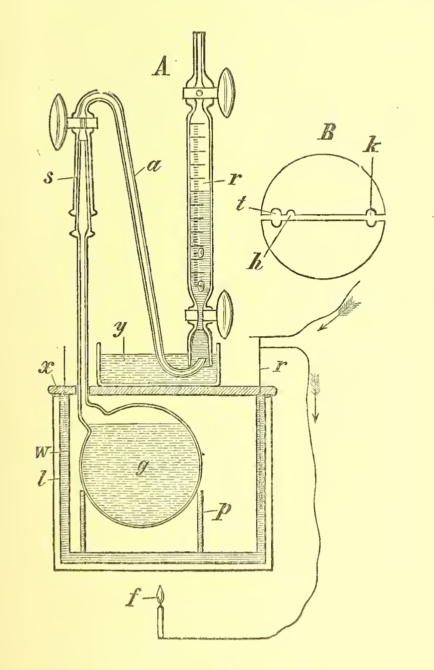


Fig. 1. *Einrichtung der Hauptgährung.*

A. Gährungskolben im Thermostaten.
g. Gährungsraum.
p. Pappenring.
h. Hals des Gährungskolbens.
a. Gasableitungsrohr.
y. Wassertrog.
r. Gasrecipient.
s. Schliff.
t. Thermometer.
f. Flamme.
w. Wassermantel des Thermostaten.
e. Luftmantel.
x. Holzdeckel.
r'. Thermoregulator.

B. Der aus zwei Hälften bestehende Holzdeckel.
k. Oeffnung für den Thermoregulator.
t. „ „ das Thermometer.
h. „ „ den Hals des Kolbens.

In dieser Figur sieht man den Kolben (*g*) in einem einfachen Thermostaten, welcher aus einem aus Rothkupfer gearbeiteten Wassermantel (*n*) besteht der durch den blecheisernen Luftmantel (*l*) ein-

geschlossen ist. Ausserdem findet sich noch ein zweiter, looser, in der Figur nicht mit aufgenommener Luftmantel um das Ganze. Als Deckel verwende ich eine aus zwei gleichen Hälften bestehende Holzplatte (*x*), welche derweise gearbeitet ist (Fig. 1 B) dass die Korken, womit der Thermoregulator (r^1) und das Thermometer (*t*) im Thermostaten gefestigt sind, sowie der Hals (*h*) des Gährungskolbens Raum finden in halbzirkelrunden Einschnitten [1]).

Der Gährungskolben (*g*) steht unten im Thermostaten auf einem Papperinge (*p*). Der Hals (*h*) findet sich seitlich am Kolben, oder, besser gesagt, besitzt eine eigenthümliche Biegung, damit derselbe an der Peripherie des Thermostaten nach aussen kommt. Der ganze Holzdeckel bleibt dadurch frei und kann zur Anfnahme der Wasserwanne (*y*) und des Stativ's, welches den Gasrecipienten (*r*) trägt, dienen.

Das Gasableitungsrohr (*a*) ist vermittelst eines Schliffes auf den Hals des Kolbens angebracht und kann durch einen Glashahn geschlossen werden [2]). Bei der Butylgährung geht infolge der Zoogloeabildung ein Bacterienschleim fortwährend mit dem Gase in die Wasserwanne (*y*) über, sodass man, durch das Abheben des Gasableitungsrohres von dem Schliffe am Halse des Gährungskolbens, immerfort mit dem Objectträger Material für Mikroskopie aufnehmen kann. Doch bleibt es oft erwünscht auch die Flüssigkeit dann und wann zu untersuchen, sei es chemisch oder mikroskopisch. Wie man sieht gestattet die Einrichtung eine solche Probenahme sehr leicht. Dazu ist es nur nothwendig den Kolben etwas schief zu stellen, wodurch die Flüssigkeit den Hals abschliesst und das Gas sich im Raume oberhalb der Gährflüssigkeit ansammeln muss. Anstatt Bacterienzoogloea und Gas, wird dann die Gährflussigkeit selbst übergedrückt, und kann entweder an der Schliffstelle zur Befeuchtung eines Objectträgers gebraucht, oder durch das Ableitungsrohr gefördert und in jeder beliebigen Quantität gesammelt werden. Wünscht man dann wieder die Gährungsgase abzuleiten, so hat man nur den Kolben in den Anfangstand zurück zu drehen. Es ist nicht überflüssig zu bemerken, dass man bei der gewählten Form

---

[1]) Der hier abgebildete Thermostat rührt aus dem Nachlasse von weiland A. Fitz her. Bei seinem Tode, im Jahre 1885, ist das Inventar seines Privatlaboratoriums zu Strassburg, in den Besitz der Niederländischen Presshefefabrik zu Delft übergegangen.

[2]) Ich habe auch Kolben und Ableitungsrohr aus einem Stück machen lassen, doch unzweckmässig gefunden. Auch das Anbringen des Hahnes am Kolbenstiel, anstatt, wie in der Figur am Ableitungsrohr, ist versucht, ist aber ebenfalls unbequem. Auch verschiedene Systeme mit Dreiweghähnen kamen in Verwendung, ergaben sich jedoch als nicht empfehlenswerth.

des Halses, das Gasableitungsrohr um den Hals nach allen Seiten drehen kann ohne, dass dasselbe dabei seine verticale Entfernung vom Deckel verändert. Wie bequem dieses ist für das Sammlen der Gährungsgase wird man beim Gebrauche bemerken.

Der Gasrecipient (*r*) besteht aus drei Theilen, welche durch zwei Glashähne getrennt sind, nämlich eine Auffangglocke, den kalibrirten Gasbehälter und das Ableitungsrohr womit das Gas in die Gasbürette übergeführt werden kann. Das Ableitungsrohr muss zwar eng sein um den Gummischlauch leicht aufnehmen zu können, jedoch genügend weit um sich, ohne Capillarwiderstand, leicht mit der Spritzflasche mit Wasser anfüllen zu lassen. Andere kleine Details werden sich aus der Figur ergeben.

Das Anfüllen des Kolbens mit einer vollständig luftfreien Gährflüssigkeit erfordert eine besondere Aufmerksamkeit. Wie das am Besten geschieht ergibt sich aus Figur 2.

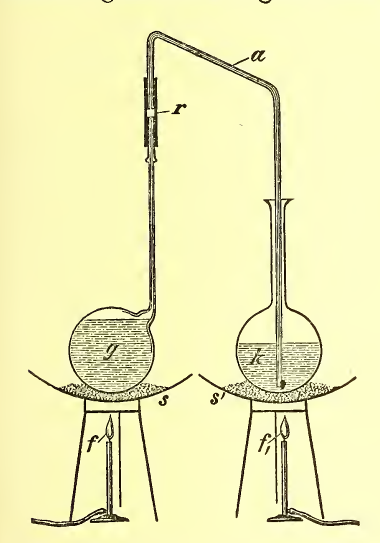


Fig. 2. *Das Anfüllen des Gährungskolbens bei Luftabschluss.*
g. Gährungskolben.
r. Gummischlauch.
a. Verbindungsrohr.
k. Kochkolben.
s, s'. Sandbäder.
f, f'. Flammen.

Neben einander sind zwei Sandbäder (*s*, *s'*) aufgestellt, worauf der Gährungskolben (*g*) und ein gewöhnlicher Kochkolben (*k*) durch Flammen (*f*, *f'*) in kräftiges Kochen erhalten werden. Durch eine Glasröhre (*a*), welche vermittelst eines Gummischlauches (*r*) mit dem Gährungskolben verbunden ist, kann der sich beim Kochen bildende Schaum in den Kochkolben (*k*) übergehen. Wenn dieser sich aber zu hoch anfullt, so hebt man den Gährungskolben etwas vom Sandbade und kühlt durch blasen den Raum oberhalb der Flüssigkeit ab, wodurch der Wasserdampf condensirt und die siedende Flüssigkeit aus *k* plötzlich überströmt und *g* wieder anfüllt. Wenn man die Luft als vollständig entfernt betrachet, entfernt man das Rohr (*r*) aus dem Gummischlauch und verschliesst diesen während das Kochen heftig fortdauert und ein Dampfstrahl hinausströmt, mit einem Glasstäbchen. Dann wird der Kolben vom Sandbade genommen und gekühlt. Natürlich entsteht ein Vacuum während der Gummischlauch sich gänzlich zusammenzieht und sich abschliesst. Dieser Verschluss ist so luftdicht, dass ich in einem im Juli angefertigten Kolben noch im October das Vacuum

vorfand, und den Inhalt in Butylgährung versetzen konnte.

Auch das Infiziren des Gährungskolbens mit dem Butylansatze oder mit getrockneten Butylbacterien oder deren Kolonien muss mit besonderer Umsicht geschehen. In Fig. 3 sieht man, wie das am geeignetsten auszuführen ist.

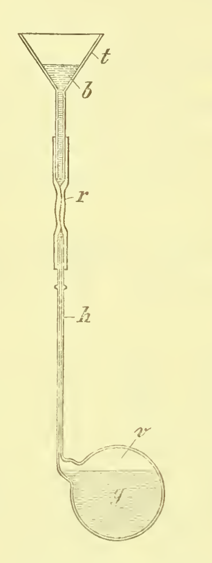


Fig. 3. *Infizirung des Gährungskolbens bei Luftabschluss.*
g. Gährungsflussigkeit.
v. Vacuum.
h. Hals.
r. Gummischlauch.
t. Glastrichter.
b. Butylansatz.

Nachdem der Sauerstoff aus der Lösung entfernt und diese auf die Gährungstemperatur abgekühlt ist wird der Gummischlauch (*r*), welcher durch das Vacuum schon zusammengepresst ist, mit den Fingern geschlossen gehalten, das Glasstäbchen entfernt und ein sterilisirter Glastrichter (*t*) oben in den Gummischlauch geschoben. Wünscht man mit dem Butylansatze zu infiziren so wird dieser derweise in den Trichter gegossen, dass die Luft aus dem Oberende des Gummischlauches entweicht. Man vermindert dann den Druck mit den Fingern, wodurch etwas vom Inhalte des Trichters in den Kolben hineingesogen wird; dan schliesst man durch vermehrten Druck den Schlauch wieder vollständig, entfernt den Trichter und sticht den Glasstöpsel in das Oberende des Gummischlauches. Wünscht man mit trockenen Bacterien, mit Bacterienkolonien, oder irgend einem anderen Materiale zu infiziren, so füllt man den Glastrichter mit etwas sterilisirtem, ausgekochtem Wasser, worin die Substanz, welche für Infection dienen soll suspendirt ist, und handelt übrigens wie oben. Der Kolben wird darauf in den Thermostaten gebracht und, wenn die Schaum- und Gasbildung so stark werden, dass der Glasstöpsel beinahe hinausgeschleudert wird, entfernt man schnell den Gummischlauch und schiebt das Gasableitungsrohr auf den Schliff des Kolbenhalses. Hat man nicht zu wenig Infectionsmaterial gebraucht so beginnt die Gährung sofort, und nach sechs oder acht Stunden ist genug Spannung im Kolben um das Ableitungsrohr aufzusetzen ohne für Luftzutritt fürchten zu müssen.

§ 6. Verlauf einer Butylgährung. Formverhältnisse und Beweglichkeit des Butylfermentes.

Ich setze voraus, dass die Gährung stattfindet in einer Gähr-

flüssigkeit, wie oben beschrieben, welche nahezu neutral, vielleicht sehr schwach sauer reagirt, welche ein Extractgewicht von c. a 10 Saccharometergraden anzeigt, nur höchstens 1 $^0/_0$ à 3 $^0/_0$ Glukose enthält und reich ist an Maltose, Maltodextrin und Malzpeptone. Die Gährungstemperatur ist 30 à 35^0 C.; bei 40^0 C. wird der Vorgang geschwächt; 35^0 C. ist vielleicht ein Optimum für die Schnelligkeit der Wasserstoff- und Kohlensäurebildung.

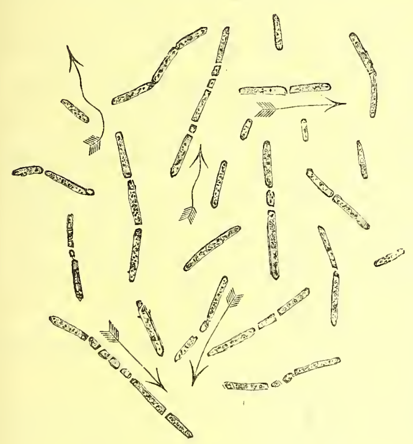


Fig. 4. (Zeiss, F. 2, Vergr. 700). *Sauerstoffform von Granulobacter butylicum.* Bewegung durch Pfeilchen angedeutet.

Eine absolute Entfernung des Sauerstoffs aus dem Butylgährungskolben ist durch Kochen wohl nicht möglich, und kann erst durch das Functioniren der Bacterien selbst eintreten. Es wurde denn auch schon gesagt, dass die Gährung anfangen kann auch wenn noch Spuren von Sauerstoff vorhanden sind. Es ist aber, wie in § 5 angeführt, sehr bemerkenswerth, dass die Form der Bacterien dadurch bedingt wird, sodass man eine „Sauerstoffform" und eine „anaërobie Form" des Butylfermentes, welche letztere in Bezug auf die Gestalt „Clostridiumform" genannt werden kann, unterscheiden muss.

Hat die Sauerstoffform sich unter Einfluss einer ganz geringen Spur Sauerstoff entwickelt, so besteht dieselbe nur aus schnellbeweglichen Stäbchen, welche *Bacillus subtilis* sehr ähnlich sind, sich jedoch davon unterscheiden durch das Vorkommen von sehr kurzen Gliedern in den noch Kettenförmig verbundenden Stäbchenverbänden (Fig. 4), so wie von eigenthümlichen „Körnern" in den Stäbchen. Gewöhnlich findet man, dabei alle Stäbchen in schneller Bewegung begriffen, doch kann die Bewegung ohne bestimmte Ursache bei einzelnen oder bei allen aufhören. Untersucht man die Beweglichkeit der Stäbchen, welche bei Sauerstofzutritt, unter dem Deckglase längere Zeit beweglich geblieben sind in einer Wasserstoffathmosphäre, so ergiebt sich, dass bei vollständigem Sauerstoffabschluss Ruhe eintritt, welche bei Sauerstoffzutritt wieder in Bewegung übergeht, und welche dann selbst bei vollem Luftdruck noch fortdauern kann.

Wenn aber die Stäbchen während ihrer Entwickelung das noch eben mit dem Wachsthume verträgliche Maximum der Sauerstoffspannung ausgesetzt gewesen sind, so verbleiben alle in vollständiger Ruhe. Besonders die reincultivirten Kolonien in Gelatine, welche so leicht etwas Sauerstoff zurückhält, bestehen aus diesem nicht

beweglichen Zustande, und wachsen oft zu langen, den gewöhnlichen Butylstäbchen durchaus unähnlichen Fäden aus. Ich folgere aus diesem letzteren Umstande dass die Beweglichkeit, welche frische, einer Gährung entnommene Präparate aufzeigen, wenn der Sauerstoff freien Zutritt hat, nur eine vorübergehende Erscheinung ist, wenn sie auch Stunden lang fortdauern kann.

Die bei vollständiger Abwesenheit von Sauerstoff entstandenen Clostridien können sich, im Gegensatze zu der Sauerstoffform, sowohl in der Mitte der sauerstofffreien Gährflüssigkeit in ziemlich lebhafter Bewegung vorfinden, wie auch, bei Gegenwart dieses Gases, sich ganz wie gewöhnliche aërobe Bacterien lebhaft bewegen. Die Natur der Bewegung bei Sauerstoffmangel ist eine eigenthümliche und unterscheidet sich dadurch von der bei Sauerstoffgegenwart stattfindenden, dass die Bacterien nur wenig Neigung zu einer Ortsveränderung aufzeigen und in einem kleinen Raum hin- und herschwimmen und schaukeln.

Um eine solche Beobachtung einwandsfrei auszuführen verfahre ich folgender Weise.

Es wird von einer kräftigen Butylgährung, mit starkem Ausfluss der Zoögloea, das Gasableitungsrohr entfernt und anstatt desselben ein Gummischlauch an den Kolbenhals verbunden. Das andere Ende dieses Schlauches geht nach einer GEISSLER'schen Glaskammer mit capillarer Verengung, welche auf dem Objecttisch des Mikroskopes ruht[1]). Die Zoögloea muss dann die Kammer durchfliessen und fliesst aus dem anderen Ende derselben, durch einen daran verbundenen Gummischlauch ab. An die beiden Gummischläuche werden Quetschhähne gesetzt, welche die durchströmende Zoögloea in Ruhe bringen, wenn sie angepresst werden zum Zwecke der mikroskopischen Betrachtung.

Ich glaube, dass bei einem solchen Versuche wohl sicher angenommen werden kann, dass auch die letzten Sauerstoffspuren aus der Glaskammer vertrieben werden können. Dass dieselben darin ziemlich lange aufgehalten werden, eben durch die eigenthümliche Form der Kammer, welche nur eine langsame Ortsveränderung der centralen Flüssigkeit im scheibenförmigen capillaren Kammerraum durch den hindurchfliessenden peripheren Strom ermöglicht, ist sicher. Jedoch, es erscheint kaum zweifelhaft, dass bei der beschriebenen Versuchsanstellung schliesslich die letzten Sauerstoffspuren mitgerissen und

---

[1]) Also die nämliche Einrichtung, welche PASTEUR verwendet hat in „Études sur la bière" pg. 288, 1876, Käuflich bei ALVERGNIAT, Paris, 10 Rue Sorbonne, Catalog 1887, N°. 185, pag. 59.

entfernt werden, so dass die Bewegung der Butylbacterie nicht allein durch den freien Sauerstoff selbst, sondern auch durch eine feste, im Protoplasma gebunden vorkommende Sauerstoffreserve, welche selbst in sauerstofffreier Umgebung erhalten bleibt, bedingt sein kann.

Das Hauptresultat dieses Versuches ist also der Beweis der Möglichkeit der Bewegung der lebenden Substanz beim vollständigen Fehlen des Sauerstoffs, wodurch diejenigen Theorien, welche die Protoplasmabewegung überhaupt auf eine Anziehung zum Sauerstoff zurückführen, sich als unhaltbar erweisen [1]).

Welche die biologische Bedeutung der Bewegung sein mag, welcher Nutzen derselben für unsere anaërobe Bacterie zukommt, — um darüber zu entscheiden müssen wir wohl an PFEFFER's chemotactische Ortsbewegungen denken [2]), und uns vorstellen, dass die Clostridien mit Bewegung reagiren auf kleine Concentrationsänderungen in ihrer Nährlösung, und das Günstigste in dieser Beziehung aufsuchen.

Die Sauerstofform des Butylfermentes lässt sich sowohl in den Gährungskolben, welche mit Reinculturen des Fermentes angestellt sind, wie in den Gelatinculten auffinden. In denjenigen Gährungen, wobei als Infectionsmaterial ein roher Butylansatz verwendet wird, welcher gewöhnlich auch *Bacillus subtilis* enthält, kann in den ersten Stadien der Gährung diese, zwar aërobe, allein nicht besonders sauerstoffbedürftige Bacterie, gegenwärtig sein. Und dieses sei desshalb hervorgehoben, weil die Sauerstoffform des Butylfermentes *Bacillus subtilis*, wie früher gesagt, sehr ähnlich ist, sodass Verwechselung damit möglich erscheint. Für das Studium der Sauerstoffform werden desshalb am Besten Reinculturen verwendet. Dass übrigens in den an Kraft gewinnenden Gährungen, aërobe Formen, wie *Bacillus subtilis* nicht fortwachsen können ist klar genug, und meine zahlreiche Gelatinculturen solcher Gährungen haben überzeugend erwiesen, dass, wenn selbst anfangs gegenwärtig, diese letztere Art sehr bald gänzlich verschwindet, und zwar so vollständig, dass ich nur auf den Tod derselben schliessen kann. Selbst *Granulobacter Polymyxa*, früher erwähnt als ziemlich constanter Bewohner der Butylansätze, und als Gährungsbacterie temporär anaërobie wie Hefe, — auch diese Form schwindet sehr bald aus den eigentlichen Butyl-

[1]) M. VERWORN, Die Bewegung der lebenden Substanz, Jena 1892.

[2]) Die chemotactischen Bewegungen von Bacterien, Flagellaten und Volvocineën, Tübinger Untersuchungen, XI pg. 582.

gährungen. Die bacteriologische Untersuchung lehrt, dass diese Selbstreinigung der gährenden Flüssigkeit von den zwei genannten Bacterienarten nahezu beendet ist zu jenem Augenblicke, wo die stäbchenförmige Sauerstoffform des Butylfermentes mehr oder weniger vollständig durch die Clostridien ersetzt ist, und bei aller Verschiedenheit in der Gestalt der Individuen, zeigt das mikroskopische Bild dem geübten Auge von da an eine unverkennbare habituelle Aehnlichkeit zwischen den Beiden. Allmählich bevölkert die Flüssigkeit sich dann stärker und stärker bis die ganze Masse zu einem Schleime wird, welcher als zäher Zoögloea zusammenhängt und bis zum Ende der Gährung mit den Gährungsgasen durch den Hals des Kolbens ausfliesst. Das ausserordentlich merkwürdige mikroskopische Bild, das sich dabei entfaltet, gehört zu den wundervollsten Objecten, welche die Gährungsphysiologie aufzuweisen hat.

Betrachten wir die darin zur Beobachtung kommenden Wandlungen zwischen Sauerstoff- und Clostridiumform noch etwas mehr im Einzelnen.

Eine eigentliche Zoögloea erzeugt die Sauerstoffform des Butylfermentes nicht; dagegen kommt sie an die Oberfläche der Gährflüssigkeit als leichter Schaum. Die Blasen enthalten sofort Wasserstoff und Kohlensäure, während, solange Sauerstoff noch da ist kein Butylalkohol entsteht.

Die zweite Phase der Gährung ist characteristisch durch die gewaltige Vermehrung der Bacterien, welche mit dem vollständigen Verschwinden des Sauerstoffs und dem Eintreten des Reductionsvorganges einhergeht. Die Form der Bacterien verändert nun rasch; granuloseführende Clostridien, einzeln und in Schnuren vereinigt, werden überall sichtbar und füllen bald die ganze Flüssigkeit derweise an, dass ein Tropfen Jod-Jodkaliumlösung ein aus dem Halse des Gährungskolbens genommenes Präparat blauschwarz färbt. Es ist das mikroskopische Bild eben dieser Phase der Gährung, welches so besonders anziehend ist. Da jeder Versuch etwas anderes zu sehen gibt kann nur ein bestimmter Fall abgebildet werden, wie das z. B. in Fig. 6 geschehen ist. Sehr verschieden sind die einzelnen Gährungen bezüglich der Beweglichkeit der Clostridien, bezüglich ihrer Dicke und Länge und ihres Gehaltes an Granulose. Noch veränderlicher in Bezug auf das wohl oder nicht Vorkommen von Sporen und in Bezug auf die Grösse und Form dieser Letzteren. Bisweilen ist alles in schneller Bewegung, bisweilen in vollständiger Ruhe, und so bleibt es dann oft 12 und mehr Stunden. Der Formenreichthum der Gährungen ist so gross, dass kaum zwei Bacterien einander vollständig gleich sind, so dass es überflüssig

ist darüber Details zu geben, wesshalb ich auf die Figuren 5 und 6 als Beispiele verweise. Zwar stellt Fig. 5 einen typischen Butylansatz (mit Weglassung der Treber) dar, doch sind ähnliche Combinationen auch in den Hauptgährungen zu finden.



Fig. 5, (ZEISS F. 2, Zeichenprisma, Verg. 700). *Granulobacter butylicum, Clostridiumform aus einem Butylansatze.* Die Treber nicht mitgezeichnet Granulose schattirt, Sporen scharf contourirt. Bewegung durch Pfeilchen angegeben.

Die innere Organisation des Butylfermentes ist sehr charakteristisch, und ich glaube dass sich im Körper desselben verschiedene Organe unterscheiden lassen. So häuft sich die Granulose in einem bestimmten, allerdings sehr formveränderlichen Theile an [1]), die Spore entsteht ebenfalls in einer bestimmten Region und ist von einem Areolarraum umgeben, wie in DE BARY's und meinen Figuren zu sehen. Im Inneren findet sich ein Raum, welchen ich als Saftraum betrachte, weil dessen Inhalt so weich ist, dass darin vorkommende Theilchen beweglich sind. Dieser Raum ist nur mit homogener Immersion, und nur in ganz glücklichen Fällen bei einzelnen lebenden Bacterien zu sehen, und wird besonders deutlich wenn das Granuloseorgan darin mit einem schweifförmigen Ansatze hineinragt, was nur selten zutrifft. Ist dieses der Fall so sieht man dieser Schweif in dem Inneren passive Bewegungen ausführen, wenn das *Clostridium* sich fortbewegt oder sich krümmt. Allenfalls liegt darin ein deutlicher Beweis, dass das Innere sehr weich, wohl flüssig sein muss, weil anders ein so zartes Gebilde, wie der Protoplasmafortsatz des Granuloseorganes, unmöglich Inertieerscheinungen würde aufzeigen können.



Fig. 6. (ZEISS, F. 3, Zeichenprisma. Verg. 1100). *Granulobacter butylicum, Clostridiumform aus einer Hauptgährung.* Granulose schattirt, Sporen scharf contourirt. Bewegung durch Pfeilchen angegeben.

Die Sporen des Butylfermentes gehören zu den grössten bisher bekannt gewordenen Bacteriensporen, sie messen sehr oft 2 μ Länge, bei

---

1) Dasselbe Verhalten findet sich im Glycogenorgan von *Saccharomyces*, sowie in den Amyloplasten der niederen Grünalgen, z. B. bei der Gattung *Chlorella.*

1 μ Dicke; ihre Gestalt ist ellipsoidisch oder cylindrisch, mit abgerundeten Enden. Durch ihre Grösse sind sie leicht erkennbar selbst in Gemisch mit Heupilzsporen. Sie keimen unter Verflüssigung oder Verschleimung der ganzen Sporenwand, was sich unter dem Deckglase in einem durch Paraffin abgeschlossenen Würzetropfen beobachten lässt. Kapselartiges Aufplatzen der Wand findet sicher nicht statt, wodurch sie sich von den Heupilzsporen unterscheiden.

Im hyalinen Protoplasma der Butylclostridien finden sich Granula; einen Zellkern konnte ich nicht beobachten.

§ 7. Das Vorkommen von gebundenem Sauerstoff in den Gährungwürzen. Ausgang und Ende der Butylgährung.

Niemals habe ich eine Butylgährung gesehen (und ebensowenig eine Kolonie bei der Gelatineculter), welche durchaus keine Stäbchen und nur ausschliesslich Clostridien enthalten hätte. Welche die Ursache für die Entstehung der Clostridien auch sein mag, in allen Bacterien einer Gährung kann dieselbe mithin nicht gleichmässig herrschen. Da die Gährungsflüssigkeit an sich keine Differenzen darbietet ausreichend um ein so auffallendes Verhalten zu erklären, so müssen dabei innere Zustände maassgebend sein. So viel steht ferner fest, dass diese Zustände vorübergehend sind und rückgängig gemacht werden können, denn es ist sicher, dass Stäbchen und Clostridien in Gelatincultur gebracht identische Kolonien erzeugen, und ich kann die Vermuthung nicht unterdrücken, dass die Formverschiedenheit mit der durch Reduction, oder mit der aus der Lösung direct aufgenommenen Sauerstoff und dessen Anhäufung in den Stäbchen zusammen hängt, zu welchem Schlusse eben die Existenz der Sauerstoffform und der Clostridiumform des Fermentes veranlassen.

Ist eine Flüssigkeit mit einer so gewaltigen Fruchtbarkeit für die Entwickelung lebender Substanz, und worin die Formverhältnisse der Bacterien irgend eine Sauerstoffwirkung eben wahrscheinlich machen, trotzdem sauerstofffrei? Oft habe ich mir diese Frage gestellt und auf verschiedene Weisen versucht die sichere Entscheidung davon herbeizuführen. Die Sache ist von der höchsten theoretischen Bedeutung, denn es handelt sich um den Nachweis ob es eine ununterbrochene, endlose Anaërobiose überhaupt giebt, oder ob auch hier, wie bei der Hefe, die Anaërobiose nur vorübergehend ist.

Die Antwort muss wie folgt gegeben werden.

Während Hefe nur einige wenige (zwanzig bis dreissig) Zelltheilungen ohne freien Sauerstoff ausführen kann und dann in einem sauerstofffreien Medium aufhört zu wachsen, aufhört Zucker zu vergähren und schliesslich unter Aufplatzen der Zellen abstirbt, ist dieses alles bei dem Butylfermente ganz anders. In der nämlichen Gährflüssigkeit, worin die Hefe mit freiem Sauerstoff kräftig wachsen und gähren würde, ohne Sauerstoff jedoch abstirbt, vermag das Butylferment beim vollständigen Fehlen des Sauerstoffs ins unbegrenzte weiter zu wachsen und zu gähren. Ich habe sieben successive Butylgährungen bei so vollständig möglichem Sauerstoffabschlusse mit Impfmaterial, welches jedesmal der vorigen Gährung entlehnt war, stattfinden lassen, ohne, dass selbst bei dem siebenten Versuche auch nur die geringste Verminderung der Gährintensität oder irgend eine andere besondere Erscheinung zur Beobachtung gekommen ist. Das heisst also, mehrere Millionen von Zelltheilungen können bei Abwesenheit vom freien Sauerstoff ohne irgend welche Unterbrechung herbeigeführt werden.

Die Butylgährung wird nicht beeinträchtigt durch neutrales Indigschwefelsauresnatrium. Trägt man dieses Salz vor dem Kochen der Gährflüssigkeit hinzu so entsteht eine dunkelblaue Nährlösung. Nun wissen wir, dass die Butylbacterien sehr stark reduzirend wirken und sobald die Gährung anfängt ist auch das Indigblau schon in Indigweiss umgewandelt. Ich betrachte dieses als ein sicheres Zeichen das freier Sauerstoff dann nicht mehr gegenwärtig sein kann; trotzdem wird die Gährung von da an erst recht lebhaft.

Hier kann man jedoch einwenden, dass die Bacterien zuvor den allerdings sehr geringen Gehalt an freien Sauerstoff der Flüssigkeit verzehrt haben müssen und davon vielleicht längere Zeit leben können. Um auch diesen Einwand zu beseitigen verfahre ich wie folgt.

Das SCHÜTZENBERGER'sche Reactiv, Natriumhydrosulfit ($SO^2 Na^2$), ist ein starkes Reductionsmittel, welches die Eigenschaft besitzt für das Butylferment nicht giftig zu sein und sich beim Kochen nicht zu zerzetzen. Ich habe nun meiner Gährflüssigkeit zunächst Indigschwefelsauresnatrium zugesetzt und dann so viel Natriumhydrosulfit bis das Indigblau vollständig zu Indigweiss reduzirt war, dann noch überdiess ein geringes Uebermaass von Hydrosulfit, so, dass hineingeschüttelte Luft das Indigweiss nicht bläute. Auch diese überreduzirte Flüssigkeit hat sich für die Butylgährung als durchaus geeignet ergeben, so dass ich es als erwiesen betrachte, dass das Butylferment sich ohne gelösten Sauerstoff bis ins Unendliche vermehren kann.[1])

---

[1]) Wie sich Alkoholhefe einem solchen überreduzirten Medium gegenüber verhält, werde ich bei einer anderen Gelegenheit betrachten. (Vergl. auch § 12, p. 46).

Verlassen wir diese Angelegenheit jedoch nicht ohne den „gebundenen Sauerstoff" schärfer ins Auge zu fassen.

Alle kräftige Gährungen mit Butylferment sind mit Malz-Roggen-Würze erhalten. Nun wissen wir durch PASTEUR[1]) dass die Würze eine beträchtliche Sauerstoffmenge nicht nur physisch löst, sondern auch chemisch bindet, derweise, dass dieser gebundene Sauerstoff durch Kochen nicht entfernt werden kann. Nach PASTEUR soll die Hefe diesen gebundenen Sauerstoff jedoch verwenden können. Wenn dieses wirklich so ist so wird das Butylferment dazu um so besser geeignet sein weil es eine stark reduzirende Wirkung auf das Gährmedium ausübt, eine Function welche der Hefe vollständig abgeht[2]). Ich meinerseits bin nicht überzeugt, dass die Hefe, wie PASTEUR will, den gebundenen Sauerstoff für die Unterhaltung ihres Lebens verwenden kann, glaube aber, dass PASTEUR'S Schluss für das Butylferment unbedingt richtig ist und, dass dieser Organismus, durch das Reductionsvermögen, das zu erreichen vermag was andere Organismen durch ihre Sauerstoffathmung erreichen, nämlich die bleibende Unterhaltung und die Möglichkeit der Fortexistenz ihrer Lebenskraft. Thatsache ist, dass die wenigen bisher bekannten Obligatanaërobien, welche gähren können, dieses nur dann thun, wenn reductionsfähiges Nährmaterial vorliegt, und dass bei ihnen auch immer die Reductionsfunction nachweisbar ist.

Einen bestimmten Augenblick anzugeben für das Ende einer Butylgährung vermag ich nicht. Die stürmische Gasentwickelung, welche mit dem intensiven Wachsthume des Fermentes parallel geht, dauert, je nach Umständen, zwei bis drei Tage. Nach dem dritten Tage dürfte kaum mehr Vermehrung stattfinden und die Erzeugung von Butylalkohol erlöscht ebenfalls; dagegen kann die Gasbil-

---

[1]) Études sur la bière pg. 357. Paris 1876. Ein Liter Bierwürze löst z.B. nach PASTEUR 7 cM^3 freien Sauerstoff und bindet davon chemisch 41 cM^3, also c.a. sechs mal soviel.

[2]) In PASTEUR'S Darstellung (l. c. pag. 364) stosse ich auf die folgende Schwierigkeit. Das Natriumhydrosulfit wird verwendet um den gelösten Sauerstoff zu titriren; als Indicator dient Indigschwefelsauresnatrium, welches durch das Hydrosulfit in Indigweiss übergeht, also reduzirt wird. Hefe reduzirt Indigschwefelsauresnatrium jedoch nicht, erscheint in dieser Beziehung also als kein reduzirendes Agens. Hefe soll nach PASTEUR dagegen den gebundenen Sauerstoff der Würze verbrauchen, irgend einen bestimmten wenn auch unbekannten Körper aus der Würze also wohl reduziren, während Natriumhydrosulfit, welches in Bezug auf Indigo so kräftig reduzirend wirkt, der Würze nur den gelösten, nicht den gebundenen Sauerstoff entziehen sollte. Dieses scheint mir aber ein Widerspruch, welcher sich dadurch aufheben lässt, dass der Hefe das Vermögen den gebundenen Sauerstoff der Würze zu verbrauchen überhaupt abgesprochen wird.

dung dann noch Wochen lang bei Zimmertemperatur fortdauern. Während dieser Nachgärung wird die Flüssigkeit allmählich dünnflüssig und das mikroskopische Bild zeigt, dass die Bacterienkörper theilweise verschwinden, sowohl das Granuloseorgan, wie das farblose Protoplasma nehmen dabei bedeutend an Raum ab, und in lange aufbewahrten Culturen kann es selbst schwierig werden Granulose überhaupt mit der Jodreaction sichtbar zu machen. Die Sporen bleiben natürlich unversehrt, verlieren jedoch, nachdem sie ein Jahr in der Gährflüssigkeit aufbewahrt sind ihre Keimkraft. Diese sämmtlichen Erscheinungen, mit Ausnahme der Nachgährung, welche bei Sauerstoffzutritt aufhört, dürften von der An- oder Abwesenheit dieses Gases unabhängig sein, und nur durch das Verschwinden der Nährstoffe bedingt werden.

§. 8. Ueber die Butylgährungsgase und den Butylalkohol.

Da die Sauerstoffformen der Granulobacterien bei den täglich in der Praxis zu beobachtenden spontanen Gährungen nicht gekochter Mehlteige, in Bezug auf die dafür characteristischen stürmischen Gasentwicklungen die eigentliche Hauptrolle spielen, so würde ich hier naturgemäss mit der Besprechung jener Verhältnisse anfangen können. Ich ziehe es jedoch vor dieses bei einer anderen Gelegenheit zu thun, im Zusammenhange mit der Lebensgeschichte von *Granulobacter saccharobutyricum* und den Milchsäurefermenten. Es würde mich nämlich hier zu weit führen die eigenthümlichen Erscheinungen, welche dabei zur Beobachtung kommen, genügend zu würdigen, besonders desshalb, weil alles was bisher über die Bacterien des Brodteiges geschrieben ist nur geringe Bedeutung besitzt, und den Kern der dabei für die Praktiker und für die Wissenschaft obwaltenden Fragen überhaupt nicht trifft, sodass die Sache nicht mit wenigen Worten zu erledigen ist.

Da die Gasbildung bei der Butylalkoholgährung eine sehr heftige ist und bei der Verwendung von Literkolben nur wenige Stunden erforderlich sind um mehrere hundert cM^3 Gas zu sammlen, so ist es leicht in wenigen Tagen ganze Reihen von Gasanalysen auszuführen. Da es hierbei nicht um den höchsten Grad der Genauigkeit zu thun sein kann, ist Hempel's Methode mit den Kugelpipetten bequem zu folgen. Zunächst ergibt sich, dass die Gase von Anfang bis zu Ende der Gährungen nur aus Wasserstoff und Kohlensäure bestehen, sodass dieselben durch Palladiummohr und Aetznatron vollständig absorbirt werden. Irgend eine Spur von Methan oder

anderen Kohlenwasserstoffen, sowie von Stickstoff, bleibt nach der genannten Absorption nicht zurück [1]).

Solange die Sauerstoffform des Butylfermentes in den Gährungen vorherrscht übertrifft das Wasserstoffvolum weitaus dasjenige der Kohlensäure. Für dieses erste Stadium der Gährung, welches immer mit der Gegenwart von mehr oder weniger Glukose in den Würzen zusammenfällt, gebe ich als mittelere Zahl der Zusammensetzung $CO^2 + 4 H^2$, also auf 1 Vol. Kohlensäure 4 Vol. Wasserstoff.

Sobald die Anaërobiose vollständiger wird nimmt der Wasserstoffgehalt der Gase ziemlich schnell ab. Während des Hauptstadiums der Gährung, worunter ich die Periode des schnellsten Bacterienwachsthums und der reichlichsten Butylalkoholbildung verstehe, ist das Verhältniss im Mittel $CO^2 + H^2$, also gleiche Volumen. In den darauf folgenden Stadien bleibt dieses Verhalten entweder bestehen oder die relative Zunahme der Kohlensäure dauert fort. Findet Letzteres statt, so kommt schliesslich eine Zusammensetzung von $5 CO^2 + H^2$, das heisst 5 Mal mehr Kohlensäure wie Wasserstoff zur Messung. In den Nachgährungen, besonders bei niedriger Temperatur, steigt dann wieder der Wasserstoffgehalt etwas.

Merkwürdigerweise geben verschiedene Kolonien aus einer Reincultur, welche in Würze derselben Zusammensetzung ausgesäet werden, in den vorgeführten Beziehungen kein identisches Resultat. Wie das zu erklären ist weiss ich nicht sicher zu sagen, doch glaube ich dass die Erscheinung ursächlich verbunden ist mit dem mehr oder weniger deutlich Hervortreten der, als Sauerstoffform und Clostridiumform bezeichnetten Zustände, der die Kolonien zusammensetzenden Bacterien. Hier muss ich aber bemerken, dass selbst in jener Anfangsperiode der Gährung, während welcher die Sauerstoffform des Butylfermentes noch vorherrscht, eventuell hinzugefügtes Indigschwefelsauresnatrium schon zu Indigweiss reduzirt wird, sodass, wenn der Sauerstoff die Wandelung im Verhältniss der Gase wirklich beherrscht, was ich als wahrscheinlich betrachte, hier nur an die feste Sauerstoffreserve des Bacterienplasma's, so wie auch vielleicht an die in der Würze gebunden vorkommende, gedacht werden kann.

Aus dem Vorhergehenden sieht man, dass es illusorisch sein würde eine chemische Formel für die Butylalkoholgährung aufzustellen,

---

[1]) Das Sumpfgas der Moraste kann also wohl nicht Produkt der Butylgährung sein. Auch *Granulobacter saccharobutyricum* erzeugt niemals Methan. Ich hebe dieses hervor weil Hoppe-Seyler den *Bacillus Amylobacter* für die Sumpfgasgährung auftreten lässt. In Bezug auf *Granulobacter lactobutyricum* kann ich nur sagen, dass diese Bacterie aus Calciumlactat ebenfalls nur Kohlensäure und Wasserstoff erzeugt, und bei meinen Versuchen die Kohlehydrate nicht recht anzugreifen vermochte.

welche ein quantitatives Maass für die Gasentwicklung ausdrücken sollte. Es ist offenbar die Substanz der Bacterienkörper selbst, welche bei dieser Gährung so massenhaft entsteht, und die nicht in eine chemische Formel unterzubringen ist, wodurch die Zahlenverhältnisse zu nichten werden.

Auch in Bezug auf das Rendement an Butylalkohol ist bisher keine bestimmte Angabe aufzustellen, nur kann ich hervorheben, dass aus den Butylansätzen, welche künstlich mit trockenen Butylbacterien infizirt und welche von Anfang an frei von *Gr. saccharobutyricum* waren, 1 bis 3 % des Gerstenmehles als Butylalkohol abdestillirt wurde. Aus guten Hauptgährungen erhielt ich 1 bis 2 % des Alkohols auf das Mehl berechnet. Den Vergährungsgrad durch Saccharometeranzeige zu verfolgen ist wegen der Zoogloeabildung nicht thunlich.

Der Alkohol siedet bei c.a 117° C. und löst sich bei 15° C. in c.a. 10 Theilen Wasser, woraus er durch Chlorcalcium abgeschieden werden kann. Beim Rectifiziren geht ein wenig eines Alkohols über, welcher ein niedrigeres Kochpunt hat, vielleicht Propylalkohol. Uebrigens ist das Product sehr rein. Wäre der Butylalkohol ein technisch wichtiger Körper, so wäre dessen Darstellung im Grossen nach meinem Verfahren praktisch ausführbar.

§ 9. Gewinnung der Butylbacterien. Stickstoffgehalt derselben.

Die Productivität der kräftigeren Butylgährungen an Bacteriensubstanz ist eine so grosse, dass die (nicht säuerenden) vollständig sauerstofffreien Butylwürzen, schliesslich ganz und gar zähschleimig werden. Es ist sehr interessant aus einer solchen Gährung die Bacterienzoogloea zu präcipitiren. Dieses kann mit nahezu absoluter Vollständigkeit mit starkem Alkohol geschehen, wodurch die Zoogloea coagulirt und als zähe Masse, ähnlich wie Fibrin, mit einem Glasstabe, woran sie leicht festklebt, aus der Mutterlauge entfernt werden kann. Diese Masse kann auf einer starken Glasplatte ausgepresst werden bis nahezu zur Trockenheit, sodass die vergohrene Flüssigkeit daraus sehr vollkommen verschwindet, wobei eine lederbraune ziemlich feste Platte erhalten wird, welche nur aus Bacterien besteht. Getrocknet im Thermostaten bei 37° kann die Masse leicht pulverisirt werden. Die Butylfermentsporen sind darin alle lebendig, und die Bacterien selbst sind nur theilweise abgetödtet.

Die vollständige Ausfällung der Zoogloea findet statt, wenn soviel Alkohol hinzugefügt ist, dass das Ganze c.a. 70 % Alkohol enthält. Fährt man dann noch weiter fort Alkohol hinzuzusetzen so werden

auch die nicht vergohrenen Dextrinen niedergeschlagen, was jedoch, wie gesagt, nicht geschieht durch den verdünnteren Alkohol während der Abscheidung der Bacterien. Ich will noch hinzufügen, dass dieser merkwürdige Vorgang nur einmal geschehen kann, das heisst, vertheilt man eine schon abgepresste Zoogloea in Wasser und versucht denselben dann wieder mit Alkohol zu präcipitiren, so entsteht ein diffuser Niederschlag, welcher sich nicht gut reinigen lässt und nur schwierig zu sammlen ist. Auch muss der Forscher, welcher diesen Versuch wiederholen will, darauf Bedacht nehmen, dass das Präcipitiren während des Höhepunktes der Gährung geschehen muss, oder doch sofort nachdem die Gährung beendet ist, da später ebenfalls nur diffuse Niederschläge mit unbequemen Eigenschaften erhalten werden. Wegen des Alkoholverbrauches ist dieser Verfahren natürlich nicht wohlfeil. Dessenungeachtet kann es doch ruhig als ein durchaus als industriell zu bezeichnendes betrachtet werden, und hätte man Bedürfniss an das Butylferment im Grossen, wie an die Presshefe, so würde der geschilderte Vorgang sicher erfolgreich sein. Wie die Sachen derzeit stehen ist es eine interessante Methode um eine der merkwürdigsten Bacterienarten, im Grossen, für wissenschaftliche Zwecke zu gewinnen.

Auf die beschriebene Weise dargestellt bildet das Butylferment eine braune Spröde geschmacklose Masse, welche einen schwachen angenehmen Geruch hat und c.a. 15 % Wasser enthalt. Zerbricht man ein Stück, so findet man das Innere gewöhnlich leichter gefärbt, wie die Oberfläche, sodass offenbar leicht oxydabele Körper darin Gegenwärtig sind. Pulverisirt und in Wasser gebracht schwillt das Pulver bald an zu einem zähen Zoogloeaschleime, welches unter dem Mikroskope das schönste Bild vom Butylfermente vorführt. Tryptische Eigenschaften hat das Pulver gar nicht, dagegen wirkt es sehr stark amylolytisch, auch dann noch, wenn die Bacterien darin abgestorben sind. Besonder hübsch kann man dieses beobachten mit Hülfe der Diffusionsmethode in einer dünnen Stärkekleistergelatineplatte, worauf einwenig des Pulvers gelegt wird, welches zwölf oder mehr Stunden sich selbst überlassen bleibt, wonach die Platte mit einer Jodlösung übergossen wird, also durch einen ähnlichen Versuch, wie fruher bei den Butylkolonien beschrieben. Es diffundirt dann die Butyldiastase in die Kleistergelatinplatte hinein und erzeugt ein kreisrundes Diffusionsgebiet, welches durch die Jodlösung nicht mehr gefärbt wird. Hat man ein frisches Pulver hinauf gelegt, so vermögen die Bacterien unter diesen ziemlich ungünstigen Bedingungen dennnoch Lebenserscheinungen aufzuzeigen, indem sie sich, in der Mitte der durch Imbition entstandenen Zoogloea ein luftfreies Me-

dium schaffen, worin Bewegung entsteht, und selbst Sporenkeimung und ein Anfang von Wachtstum stattfinden kann. Letzteres erlischt allerdings durch den ungünstigen Nährboden sehr bald. Das Pulver ist reich an Granulose und färbt sich mit Jod violetschwarz. Wird es mit Wasser lange gekocht, so löst sich nur wenig Granulose, jedoch genug um das Wasser, bei Jodzusatz, blau zu färben. Bei sehr langem Kochen mit Säuren verschwindet die Granulose und man findet Dextrin und Zucker in der Lösung; diese Umwandelung geschieht aber sehr schwierig. Viel leichter dagegen lasst sich die Granulose durch die verschiedenartigsten Amylasepreparaten verzuckeren.

Aus einem Liter Würze von 11 Saccharometergraden erhielt ich c.a. 30 Gr. zwischen Glasplatten gänzlich abgepresste feuchte Bacterienzoogloea hieraus 7 Gr. luftrockene Bacterien und, da diese noch 14 % bis 17 % Wasser enthalten, c.a 6 Gr. bei 110° C. getrocknete Bacteriensubstanz.[1]) Der Stickstofgehalt dieser trockenen Masse ist etwas verschieden, je nach dem Zustande der Gährung. So fand ist in einem Muster, welches aus einer nahezu glukosefreien Gährung, als diese ihren Höhepunkt erreicht hatte, präcipitirt war, nach KJELDAHL's Verfahren, 4.01 % Stickstoff, was durch Multiplizirung mit dem Factor 6,25 auf 25.06 % Eiweiss auskommt. Bei einer mit 2 % Glukose angestellten Butylgährung fand ich in der bei 110° C. getrockneten Bacteriensubstanz 4.395 % Stickstoff oder 27.468 % Eiweiss. Zum Vergleiche mit einem anderen Gährungserreger erinnere ich daran, dass man in den activeren Presshefevarietäten des Handels, ungefähr doppelt soviel Stickstoff findet nämlich 7 à 9 %.

Nimmt man an, dass die lebenden Bacterien 80 % Wasser enthalten (Presshefe wird auf 75 % Wassergehalt angeschlagen), so findet sich in den restirenden 20 Gr. Bacteriensubstanz, wenn diese auf 27.46 % Eiweiss angesetzt wird, 5.59 Gr. Eiweiss, welches also durch Wasserimbibition den Protoplasmakörper der Bacterien darstellen muss. Vom Gesammtkörper der lebenden Bacterien beträgt das Granuloseorgan 25 bis 50 %[2]) und ist desshalb unzweifelt selbst von protoplasmatischer Grundlage. Die Sporen ergeben, bei mikroskopische Messung, einen Raum von c.a 10 % des Bacterienkörpers. Ueber den Raum der Schleimhüllen wage ich nicht eine Vermuthung auszusprechen.

Jahre lang in trokenem Zustande aufbewahrt verlieren die auf die

---

[1]) Merkwürdigerweise würde sich aus einen Liter dieser nämlichen Würze ebenfalls c.a. 30 Gramm Bierhefe erhalten lassen, jedoch nur durch das Lüftungsverfahren.

[2]) Bei *Granulobacter saccharobutyricum* selbst 60 %.

beschriebene Weise erhaltenen Bacterien ihre Vegetationskraft nicht. Ich habe z. B. im vergangenen Sommer kräftige Butylgährungen erhalten dadurch, dass ich, im Jahre 1887 geerntetes Bacterienmaterial zur directen Infection meiner Hauptgährungskolben verwendete. Auf einfachere Weise kann man sich aber von der fortdauerenden Lebenskraft des aufbewahrten Materiales durch die Darstellung eines Butylansatzes überzeugen. Man kocht dazu in einem Becherglase etwas Mehl auf, genau so, wie bei der Herstellung der Rohansätze beschrieben, siedet jedoch solange bis alles Leben darin getödtet ist, was nach 10 bis 15 Minuten beinahe immer, nach einer halben Stunden ausnahmlos der Fall ist.

Man bringt dann das zu untersuchende trockene Bacterienpulver mit einem Platinlöffel an einer gewissen Stelle tief in die bis auf 95° C. abgekühlte Masse, derweise, dass die Bacterien die Glaswand berühren. Sofort schwillt das Pulver zu einer voluminösen Zoogloea an. Nach einigen Stunden bemerkt man, dass der Mehlbrei an der infizirten Stelle dünnflüssig wird, infolge der Wirkung der aus der Zoogloea hinaus diffundirenden Butylamylase. Leben die Bacterien, so sieht man nach 24 Stunden bei 37° diesen verflüssigten Theil der Mehlmasse reichlich mit Gasblasen angefüllt, der angenehme Butylalkoholgeruch wird kenntlich und die Clostridien verbreiten sich in allen Richtungen durch den Mehlbrei. Bei diesem Versuche muss beim Infiziren mit dem Platinlöffel das Hineinbringen grosser Luftblasen möglichst vorgebeugt werden, was übrigens sehr leicht ist. Natürlich kann ein solcher Butylansatz wieder für das Anstellen einer neuen Hauptgährung verwendet werden.

§ 10. Die Granulobactergranulose und die Granulobacterdiastase.

Ein hübsches Beispiel von der Vollständigkeit, womit die lebende Substanz räumlich neben einander vorkommende Körper, welche bei Contact energisch auf einander einwirken müssten, getrennt zu erhalten vermag, ist die Granuloseablagerung in der Mitte der Granulobacterien, welche an ihrer Oberfläche reichlich Diastase ausscheiden.

Dass diese beiden Processe wirklich zu gleicher Zeit stattfinden, das lehrt die Anhäufung der Diastase während der Butylgährungen, welche ebenfalls characterisirt sind durch das so ausgiebige Wachsthum von mit Granulose angefüllten Clostridien, wodurch ein Tropfen der gährenden Flüssigkeit sich mit Jodlösung dunkel violetblau färbt.

Auf Grund dieser Erfahrungen war zu erwarten, dass die vermittelst Alkohol aus den Butylgährungen präcipitirten Zoogloeen sowohl

reich an Granulose wie an Diastase sein müssten; was denn auch wirklich zutrifft. Ueberdies bleibt noch viel Diastase in der Mutterlauge zurück.

In Bezug auf den Nachweis dieses letzteren Körpers sei noch Folgendes angeführt.

Bringt man in die Tiefe eines bis auf 95° C. abgekühlten Mehlteiges ein wenig einer getrockneten, zu Pulver zerriebenen Zoogloea und stellt die Masse bei 37° C. so bildet sich, wie wir in § 9 gesehen, schon nach wenigen Stunden ein localer Verflüssigungsheerd.

Da hierbei jedoch Bacterienwachsthum beginnen kann, sodass an eine Neubildung der Diastase gedacht werden kann, so sei bemerkt, dass auch, durch Verweilen in Aether oder Chloroform abgetödtete Zoogloeen diese Reaction zeigen können. Hierbei ist aber zu empfehlen die Hinzufügung des Preparates zum Mehlteige nicht bei 95° C., sondern bei niederer Temperatur und zwar unterhalb 70° C. erfolgen zu lassen, weil anders die Diastase geschädigt wird.

Fügt man die pulverisirte Butylzoogloea oder ein daraus bereitetes Amylasepreparat [1]) zu einem dicken Stärkekleister bei 50° à 60° C. so findet auch darin schnelle Verflüssigung statt. Zuerst entsteht dabei viel Dextrin, welches jedoch bald verschwindet und durch Maltose ersetzt wird. Welchen Verlauf dieser Vorgang nimmt ist mir aber nicht genau bekannt, nur ist derselbe nicht zu parallelisiren mit der Zuckerbildung durch Malzdiastase, da diese auf die Zusammenwirkung zweier Enzyme beruht, während die Butylamylase ein einfacher Körper ist.

Uebrigens steht letztere Stoff der Malzdiastase in so weit sehr nahe, dass das Temperaturoptimum der Amylolyse für beide bei ungefähr 60° C. liegt, dass beide durch eine Spur Säure activirt durch Alkali stark beeinträchtigt werden, während Ptyalin und die damit identische Pancreasdiastase eben durch eine Spur Alkali gefördert werden, schliesslich, das die Butylamylase oberhalb 60° C. mehr und mehr inactiv wird und aus den Lösungen als Coagulum niederfällt, ebenso wie die Malzdiastase. Inzwischen dürfte die Temperatur der schnellen Zersetzung für die Butylamylase bei 75° C. liegen, also höher wie bei der Malzdiastase, wo dieselbe c.a. 68° C. ist.

Die durch Butylamylase erzeugte Maltose ist wahrscheinlich identisch

---

[1]) Um dieses zu erhalten ist es am einfachsten eine kräftige Butylgährung in Würze über Porzellan zu filtriren und das Filtrat mit Alkohol zu präcipitiren, oder eine solche gährende Würze zuerst durch Alkohol von der Butylzoogloea zu befreien und die Mutterlauge dann mit Alkohol in Uebermaas zu präcipitiren, wobei zwar viel Dextrin mitherausfällt, jedoch nur sehr wenige Bacterien.

mit der gewöhnlichen Maltose, jedenfalls können die Maltosehefen daraus Alkohol und Kohlensäure erzeugen, während dieselbe von den Glukosehefen, wie *Saccharomyces Mycoderma*, sowie von den Lactosehefen, wie *Saccharomyces Kefyr* und *S. tyrocola*, nicht assimilirt und nicht vergohren wird.

Die Erythrodextrinbildung ist bei der Butylamylolyse eine schneller vorübergehende Erscheinung, wie bei der Einwirking der Gerstenmalzdiastase, jedoch deutlich wahrnehmbar, eben wie bei Einwirkung von Maismalzdiastase, welche der Butyldiastase nahe steht. Glukosebildung findet bei der Umsetzung durch Butylamylase nicht statt, während gewöhnliche Malzdiastase, infolge eines geringen Gehaltes an Glukase, Spuren von Glukose erzeugt, welcher Zucker deswegen in den Malzwürzen nimmer vollständig fehlt, dagegen, in vorher gekochten Butylansätzen durchaus nicht vorkommt.

Es ist hier vielleicht die Stelle um ein Wort zu widmen an die durch MITSCHERLICH entdeckte[1]), später so vielfach besprochene Auflösung der Cellulose unter dem Einfluss von „*Bacillus Amylobacter*". Auf vielerlei Weisen habe ich versucht Sicherheit zu bekommen in Bezug auf die Rolle, welche das Butylferment dabei vielleicht ausüben konnte. Hierbei habe ich zunächst die Butyldiastase ins Auge gefasst, und deren Einfluss auf Cellulose von verschiedener Herkunft fesstgestellt. Es wurde dazu Cellulose bereitet aus Filtrirpapier, aus Dattelkernen und aus den Samenlappen von *Tropaeolum majus*, welche Körper in SCHWEIZER's Reactiv gelöst, mit Salzsäure präcipitirt und vollständig von Kupfer gereinigt wurden. Es hat sich ergeben, dass das Enzym auf die so erhaltene Cellulose nicht einwirkt; nur gekochter Stärkekleister und die Dexrinen werden dadurch angegriffen.

Als diese Versuche ein negatives Resultat ergeben hatten, habe ich die genannten Cellulosepräparate in die Butylgährungen selbst hineingebracht, jedoch ebenfalls ohne Erfolg. Ich habe dann Flachsstengel, gekocht und ungekocht, getrocknet und frisch, in die Butylgährungen gestellt, konnte jedoch nach 24 Stunden und länger, keine mikroskopisch sichtbare Corrosionen der Bastfasern auffinden. Auch dünne Schnitte aus Radieschen blieben unversehrt. Aus alledem folgere ich, dass die nicht anzuzweiflende Möglichkeit der Cellulolösung durch Mikroben durch einen noch nicht erkannten physiologischen Vorgang stattfindet, welcher jedenfalls nicht durch die Reinculturen der Granulobacterien veranlastt wird. Es ist mit dieser

---

[1]) Kön. Preussische Akad. d. Wissensch., 1850. pag. 105.

Ansicht in Uebereinstimmung, dass Herr VAN SENUS[1]), welcher den Vorgang des Verschwindens der Cellulose durch Mikrobienwirkung eingehend verfolgt hat, findet, dass hierbei eine vitale Contactwirkung (also wie in der keimenden Dattel) stattfindet, und dass hierbei wenigstens zwei Mikrobenarten zugleicher Zeit gegenwärtig sein müssen um den Vorgang zu ermöglichen. Welche diese Arten sind bleibt einstweilen unentschieden, doch dürfte *Granulobacter Polymxa* eine davon darstellen.

Ob die Cellulosegährung, wie HOPPE-SEYLER annimmt[2]), mit der Methanbildung zusammenhängt, muss ebenfalls noch entschieden werden, denn mir scheint es noch nicht genügend erwiesen, dass das Methan bei seinen Versuchen nicht aus eiweissartigen Körpern entstanden sein sollte.

§ 11. BIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER GÄHRUNGEN. REDUCTIONSFUNCTION DES BUTYLFERMENTES.

Ich habe schon bei einer anderen Gelegenheit darauf aufmerksam gemacht[3]), dass das eigentliche Wesen der Gährungen in der Gasbildung gelegen ist, und es wäre sehr erwünscht, dass meine Ansicht von anderen Forschern erwogen würde. Wenn dieses geschieht, so bin ich überzeugt, dass allerlei andere durch Bacterien verursachte Umsetzungen und Spaltungen, wie Pigmentbildung, Reduction, Oxydation, Lichtproduction etc., welche Vorgänge oft als Fermentwirkungen oder Gährungen bezeichnet werden, in der physiologischen Klassification eine andere Stelle erhalten werden.

Nach meiner Meinung ist jede Gährung in erster Linie, wie gesagt, durch Gasbildung characterisirt. Von diesem Gesichtspunkte sind diejenigen Gährungen bei welchen Wasserstoff entsteht, was bei weitaus der Mehrzahl stattfindet, wohl als das Prototyp der Gährungen überhaupt zu betrachten, weil dieses Gas, wegen seiner sehr geringen Löslichkeit, dem Ideal eines Gases weit besser entspricht, wie die Kohlensäure.

Wenn der eigentliche Karakter von „Gährung" Gasbildung ist, so muss in dieser Gasbildung die biologische Bedeutung des Gährung gesucht werden. Diese besteht nun, wie ich glaube, im Folgenden. Die eigentlichen Tummelplätze der Gährungsorganismen sind die Schichten unterhalb der Oberfläche des Bodens in Gärten, auf

[1]) A. H. C. VAN SENUS, Bijdrage tot de kennis der Cellulosegisting, Leiden 1890.

[2]) HOPPE-SEYLER's interresante Studie findet sich unter dem Titel „Ueber die Gährung der Cellulose mit Bildung von Methan und Kohlensäure" in seiner Zeitschrift für Physiolog. Chemie Bd. X, Heft 3, pag. 201, und Heft 5 pag. 401, 1886.

[3]) Centrallblatt für Bacteriologie, Bd. 11, pag 73, 1892.

Wiesen und Feldern, ferner, Mist und Composthaufen, der Schlamm von Graben, Seeen und Flüssen, die Tiefe der Gährbottiche der Gährungsgewerbe u. s. w., kurz, alle diejenigen Stellen, welche eben dadurch ausgezeichnet sind, dass darin freier Sauerstoff, infolge des reichhaltigen Lebens rasch verbraucht wird, und nur sehr schwierig hinzutreten kann. Nun müssen die, sich an diesen Stellen entwickelnden Gährungsgase wohl nothwendiger Weise ein Bestreben haben ihre Erzeuger von dorthin zu entfernen und dieselben anderen Orten entgegenführen, wo die Ernährungsbedingungen auch andere sind. Im Allgemeinen muss diese Bewegung gegen die freie Oberfläche jener Massen gerichtet sein, also dem freien Sauerstoff entgegen. Ich nehme nun an, dass die Fortexistenz aller Gährungserreger, auf irgend eine Weise durch den freien Sauerstoff bedingt wird. In der aus dem Sauerstoffbedürfniss sich ergebenden Nothwendigkeit den freien Sauerstoff aufzusuchen, wodurch erst die Gährung, selbst bei den Anaëroben, auf die Dauer ermöglicht wird, sehe ich also die eigentliche Bedeutung dieser Function. Unter dieser Voraussetzung ist es einleuchtend, dass diejenigen Formen, welche eine feste Sauerstoffreserve anzulegen vermögen, um dadurch zeitweise leben und wachsen zu können an denjenigen Stellen, wo, wegen Sauerstoffabwesenheit, die Aërobien nicht verweilen, dass sie von dort durch irgend ein Mittel wieder dem freien Sauerstoff hinzugeführt werden können müssen. Ist nun so frage ich, irgend ein dazu geeigneteres Mittel auszudenken, wie die Gasbildung? Aus keinem anderen Grunde wie aus der Nothwendigkeit der erneuten Aufnahme freien Sauerstoffs, nachdem die Sauerstoffreserve aufgezehrt ist, bringen die Gährungsgase die Bacterienzoogloeen, oder den Hefeschaum an die Oberfläche der Gährflüssigkeiten. Ist diese Nothwendigkeit ferner nicht eine zureichende Erklärung für die anders unbegreifliche Thatsache, dass eben der Wasserstoff, zu dessen Erzeugung ein so grosser Energieaufwand erforderlich ist, eigentlich noch viel mehr wie die Kohlensäure das characteristische Product der so zahlreichen Bacteriengährungen ist?

Hier begegnen wir aber einen scheinbaren Wiederspruch. Ich habe das Butylferment als vollkommen anaërobie bezeichnet; ich habe betont, dass die Butylgährung und das Wachsthum des Fermentes bei Sauerstoffzutritt aufhören. Sollten dennoch die Kohlensäure und der Wasserstoff dieser Gährung dazu dienen müssen das Ferment dem feindlichen freien Sauerstoff zuzuführen? Ich beantworte diese Frage, welche mir lange Zeit viel Schwierigkeit gegeben hat, gegenwärtig unbedingt befestigend und führe zur Erhärtung meiner Meinung Folgendes an.

Bei den früheren Betrachtungen über die Butylgährung haben wir immer den Gebrauch einer Würze als Gährsubstanz vorausgesetzt, welche ein ausserordentlich kräftiges Vermögen freien Sauerstoff zu binden besitzt. Wir haben gesehen, dass die Lebensfähigkeit und die Vermehrungsfähigkeit des Butylfermentes in einer solchen mit gebundenem Sauerstoff gesättigten, jedoch von freiem Sauerstoff freien Würze (worin Hefe nach c. a. dreissig Zelltheilungen abstirbt) eine unbegrenzte ist, welche jedoch in jedem *bestimmten Volumen* nach einer bestimmten Zahl von Zelltheilungen natürlicherweise durch Nährstoffmangel aufhören muss. Doch folgt aus jener unbegrenzten Wachsthumsfähigkeit in diesen eigenthümlichen Nährmedien, noch durchaus nicht, dass dasselbe zutreffen müsste in den so ganz anders zusammengesetzten Flüssigkeiten der natürlichen Fundorte. Als solche kommen z. B. Grabenschlamm und Humusfeuchtigkeit in Betracht. Welche chemische Umwandlungen das Butylferment darin erzeugt ist zwar unbekannt, doch können wir, nach Analogie, mit viel Wahrscheinlichkeit schliessen, auch darin, finde Butylalkoholgährung unter Wasserstoff- und Kohlensäurebildung statt. Dass diese natürliche Materialien aber im Stande sein sollten solche beträchtliche Sauerstoffmengen zu binden wie Würze, ist sehr unwahrscheinlich, und das Butylferment dürfte sich darin, dem freien Sauerstoff gegenüber auch anders verhalten und mehr davon bedürfen wie in Würze. Jedenfals trifft dieses zu für künstliche Nahrstofflösungen, worin ich das Ferment gezüchtet habe. Dieses ist mir z. B. gelungen in Leitungswasser mit 1 % Pepton siccum und $^1/_2$ % Stärkekleister bei niederer, 10^0 C. bis 12^0 C. kaum überschreitender Temperatur, in PASTEUR'schen Kölbchen, worin die Luft zutreten konnte. Die Entwickelung war sehr langsam, doch waren schliesslich kleine Clostridien mit Sporen allgemein, und Butylalkohol unverkennbar. Auch Wasserstoff war nachweisbar. Was jedoch für unsere Betrachtung von besonderer Wichtigkeit ist, ist die Thatsache, dass eine solche Lösung in meinen Gährungskolben, also bei Luftabschluss, eben für Wachsthum und Gährung sich als viel ungeeigneter erwies, wie in gewöhnlichen Kölbchen, wo der Sauerstoff durch den PASTEUR'schen Verschluss frei hinzuteten konnte. In dieser Umgebung war also das erwünschte Sauerstoffmaass für das Butylferment viel grösser, wie in Würze, und dasselbe trifft desshalb wohl ohne Zweifel auch für Humusfeuchtigkeit und für Grabenschlamm zu. An den natürlichen Fundorten besteht darum bei den Anaërobien sicher ein grösseres Bedürfniss an freiem Sauerstoff, als wie sich auf Grund der Experimente mit den künstlichen, zucker- und peptonreichen Würzen erwarten liess.

Ich glaube deshalb, dass ein eigentlicher Widerspruch, zu meiner Erklärung der Bedeutung der Gährthatigkeit in der obligaten Anaërobiose nicht vorliegt, und, dass auch die hierbei stattfindende Gasbildung, die nützliche Function hat den Gährungserreger dem freien Sauerstoff entgegenzuführen, wodurch er, wenn er durch Eigenbewegung, durch die Schwere, oder durch Strömungen aufs Neue in die Sauerstofffreie Tiefe anlangt, imstande ist wieder mit erneuter Lebenskraft zu gähren und zu wachsen. Nur in ganz bestimmten, in der Natur nur selten vorkommenden Flüssigkeiten, kann das obligatanaërobe Butylferment den, in eigenthümlicher Weise gebundenden Sauerstoff für jene Erneuerungszwecke durch sein Reductionsvermögen benutzen, was die Hefe jedoch nicht vermag.

Ueber die biologische Bedeutung der Butylalkoholbildung wage ich nicht eine Vermuthung auszusprechen. Für die Aethylalkoholbildung durch Hefe glaube ich aber den Nutzen für den Errerger klarer zu sehen, und ich hoffe darauf bei einer anderen Gelegenheit noch näher zurückzukommen.

§ 12. Allgemeines über Anaërobiose, Reductionsfunction und Gährung.

Für den richtigen Begriff der in § 11 angeführten und der hier zu besprechenden ziemlich verwickelten Verhältnisse ist es nothwendig Einiges aus dem früher Mitgetheilten zu wiederholen, besonders aber auf die zwei sehr verschiedenartigen Formen der facultativen Anaërobiose aufmerksam zu machen, welche bisher, selbst von den besten Physiologen nicht genügend erkannt sind.

Die eine dieser Formen kann als *permanente facultative Anaërobiose*, die andere als *temporäre facultative Anaërobiose* bezeichnet-werden. Alkoholhefe ist temporär-, Milchsäureferment der Gährungindustrie ist permanent facultativ-, oder kurz, facultativ-anaërobiotisch. In dieser Abhandlung ist schon mehrfach darauf hingedeutet, dass Alkoholhefe bei der allergünstigsten Ernährung, z. B. in Malzwürze, ohne freien Sauerstoff nur wenige Sprossungen ausführt, dann jedoch nicht weiter wächst; findet kein weiterer Zutritt von Sauerstoff statt so sterben die Zellen schliesslich unter sehr charakteristischen Aufplatzerscheinungen. Die Sprossungen und die damit verbundenen Gährungserscheinungen, welche unter diesen Umständen stattfinden, stehen unter der Herrschaft einer festen, gebundenen Sauerstoffreserve; so bald diese ausgenützt ist hört das Wachsthum auf und ebenfalls die Gährung; der Tod folgt erst später bei lange dauernder Sauerstoffentziehung. Ganz ähnlich verhält sich *Mucor racemosus*,

doch ist das Sauerstoffbedürfnis dieses Schimmels grösser, wie bei Hefe.

Um bei der Hefe die hier betrachtete Erscheinung klar an zu zeigen ist es am einfachsten wie folgt zu verfahren.

Es werden zwei meiner Butylkolben mit Würze angefüllt nnd durch Kochen ganz sauerstofffrei gemacht. Dieselben werden dann beide mit reincultivirter Bierhefe beschickt, die eine aber nur mit einer geringen Spur welche man vemittelst eines kurzen und dicken Platinfadens hinein fallen lässt, die andere mit einer grösseren Menge. Bei der Gährungtemperatur von 28⁰ C. aufgestellt ist dann der Unterschied nach 24 oder 48 Stunden zwischen den beiden Kolben sehr beträchtlich. Gährung ist zwar in beiden eingetreten, hört jedoch in dem Kolben welcher nur mit einzelnen Zellen beschickt war in folge von Sauerstoffmangel bald vollständig auf, während im zweiten Kolben unter Einfluss der mit den Zellen hineingeführten Sauerstoffreserve eine vollständige Vergährung stattfinden kann.

Die Form worin der Versuch hier beschrieben ist habe ich selbst daran gegeben. Das Princip rührt aber von PASTEUR her, welcher seinen Schüler COCHIN veranlasst hat dafür einen eigenthümlichen, aus miteinander verbundenen Glaskölbchen zusammen gesetzten Apparat zu verwenden.[1]) Ich habe ebenfalls solche Apparate anfertigen lassen, damit jedoch sehr grosse Schwierigkeiten gehabt, weil der Sauerstoff sich daraus, auch durch geduldiges Kochen kaum vollständig entfernen lässt, weil der Dunst aus den zusammenhängenden Kugelräumen nicht gut entweichen kann. Bei der Verwendung der Butylkolben, welche so besonders gut geeignet sind zur Herstellung eines luftfreien Mediums, kann man dagegen leicht expirementiren mit grossen Quantitäten sauerstofffreier Würze, worin vereinzelte Hefezellen gebracht, ihre feste Sauerstoffreserve bald erschöpfen. Ich glaube, dass mit dieser kurzen Betrachtung die Bedeutung der temporären facultativen Anaërobiose der Alkoholhefe, für den gegenwärtigen Zweck genügend beleuchtet ist.

Die permanente facultative Anaërobiose wurde als bei den industriellen Milchsäurefermenten vorkommend bezeichnet. Sie ist dadurch characterisirt, dass in den geeigneten Nährmedien, eine vollständige Unabhängigkeit vom freien Sauerstoff zu existiren scheint. Es ist mir gelungen grosse Quantitäten filtrirte Schlempe mit Rohrzucker, nach dem daraus die Luft vollständig durch Kochen vertrieben war, durch Infection mit einer *minimalen Spur* Milchsäureferment in Milch-

[1]) Annales de Chimie et de Physique pag. 312, 1880.

säuregährung zu versetzen, welche Gährung mit so gewaltiger Kohlensäureentbindung zusammenging, dass ich erst durch die mikrokoskopische Untersuchung überzeugt wurde, dass keine Alkoholgährung vorlag. Nun ist es für unsere Betrachtung wichtig zu bemerken, erstens dass das Milchsäureferment eine ganz besonders ausgeprägte Reductionsfunction aufzeigt, und zweitens, dass es mir nicht gelungen ist deutliches Wachsthum des Fermentes herbeizuführen im sauerstofffreien Raume bei vollständiger Abwesenheit reductionsfähiger Körper. Ich glaube darum, dass auch in diesem Falle Sauerstoff zeitweise zugeführt werden muss, und dass dafür die Gährfunction dienlich sein kann.

Nach dem Vorhergehenden lässt sich der Zusammenhang von der Reductionsfunction mit den drei Klassen der Anaërobiose kurz wie folgt darstellen [1]).

Temporäre Anaërobiose: Die Reductionsfunction kann fehlen, Beispiel, Hefe oder vorkommen, Beispiel *Granulobacter Polymyxa.*

Facultative permanente Anaërobiose: Reductionsfunction ausnahmslas kräftig, Beispiel Milchsäureferment der Gährungsindustrie.

Obligate Anaërobiose: Reductionsfunction ausnahmslos kräftig, Beispiel Butylferment.

Sehen wir nun den Zusammenhang zwischen Gähr- und Reductionsfunction noch etwas näher an.

Es ist behauptet worden alle lebende Zellen können unter Umständen reduzirend wirken. Wenn es sich, wie im vorliegenden Falle, handelt um ein ausserhalb der Zelle bemerkbares Effect so ist dieser Ausspruch sicher unrichtig. Selbst für die Bacterien trifft er durchaus nicht überall zu, da es manche Arten gibt, wovon reduzirende Wirkungen, trotz vielfach abgeänderter Versuchsanstellung, durchaus nicht constatirt werden konnten, in welcher Beziehung ich z. B. an die Papilionaceënbacterien erinnere. Man konnte vielleicht meinen die Gährung, als physiologischer Vorgang stehe mit Reductionserscheinungen in nothwendigem Zusammenhang, doch dieses trifft, wie wir gesehen, auch nicht zu, denn von den Alkoholhefen ist kein einziger sicher gestellter Reductionsvorgang im gewöhnlichen Sinne dieses Wortes bekannt [2]). Auch kenne ich einzelne

---

[1]) Zu vergleichen F. CAHEN, Ueber das Reductionsvermögen der Bacterien. Zeitsch. f. Hygiene. Bd. II. pg. 386, 1887.

[2]) Die vielfachen gegentheiligen Angaben in der Literatur beruhen auf Täuschung und müssen dadurch erklärt werden, dass die stetigen Begleiter von Bier- und Presshefe, nämlich die Milchsäurefermente, zu den kräftigst reduzirenden Bacterien gehören. Die Autoren welche mit reincultivirter Hefe arbeiten werden sich leicht überzeugen von der Richtigkeit meiner Angabe.

Gährungsbacterien, welche nicht imstande sind Indigschwefelsäure zu reduziren und ebensowenig Nitrate.

Dagegen muss ich auf Grund meiner allerdings beschränkten Erfahrung und in Uebereinstimmung mit dem Vorhergehenden behaupten, dass alle Obligatanaërobien sowie alle wahre Facultativanaërobien reduzirende Eigenschaften besitzen, und ich glaube auch einen nothwendigen Zusammenhang zwischen wahrer Anaërobiose und Reduction annehmen zu müssen. Dieser nothwendiger Zusammenhang besteht nach meiner Ansicht darin, dass wahre, ununterbrochene Anaërobiose, nur dann möglich ist, wenn bei den Urhebern die Reductionsfunction existirt und denselben, für die Ausübung dieser Function, reductionsfähiges Nährmaterial geboten ist. Man meine nicht letzterer Satz sei überflüssig, denn das Leben der wahren Anaërobien ist thatsächlich möglich ohne, dass Anaërobiose stattfindet, dann aber unter Verwendung von freiem Sauerstoff und nicht Reductionsfähigem Nährmaterial. Ich habe davon oben ein Beispiel genannt bei der Besprechung des Wachsthums des Butylfermentes in Reincultur in Peptonstärkelösung unter beschränktem, jedoch unzweifelhaftem Luftzutritt, und ich betonte, dass in einer solchen Lösung bei vollständiger Entfernung des Sauerstoffs, z. B. durch Kochen in einem Butylgährungskolben, nur ein sehr schwaches bald erlöschendes Wachsthum zu beobachten war [1]). Ich glaube nun, dass in diesem letzteren Falle die Anaërobiose deshalb nicht stattfindet, weil keine oder nur Spuren von reductionsfähigen Substanzen vorliegen, welche dagegen in Würze in reichlichem Maasse vorhanden sind. Das Peptonstärkebeispiel zeigt, dass die Sache für eine experimentelle Behandelung geeignet und gereift ist, nur müssen die Versuche derweise ausgeführt werden, dass nur künstliche peptonfreie, Nährlosungen dabei in Betracht kommen. Allerdings ist dieses eine Schwierigkeit, die nicht so leicht zu beseitigen sein dürfte, wenn man Gährungen zu erhalten erstrebt, welche eben so kräftig sind, wie diejenigen in Getreidewürzen. Wäre es möglich die Reductionsfähigen Substanzen dieser Würzen als chemische Individuen abzusonderen, so wäre in dieser Beziehung zwar ein wichtiger Schritt gethan. Allein manche Anweisungen scheinen dafür zu sprechen, dass es sich hierbei in erster Linie handelt um Malzpeptone, und ich kann nicht umhin zu bemerken, dass ich Peptone im Allgemeinen, und ganz besonders die des Malzes, wegen ihr Vermögen etwas Sauerstoff zu absorbiren, für die Entscheidung der Frage für wenig

[1]) Dieses allerdings vorhandene Wachsthum dürfte durch an Pepton gebundenen, nicht durch Kochen entfernbaren Sauerstoff erklärt werden.

geeignet halte. Selbst bei dem Pepton siccum des Handels ist unter Umständen eine schwache Sauerstoffabsorption ohne Gegenwart lebender Keime bemerkbar. Der oben genannte Versuch mit Pepton-Stärkelösung, welches Nährmittel, wie angeführt, noch ein beschränktes anaërobes Wachsthum des Butylfermentes erlaubte, wird eben durch letzteren Umstand zwar weniger überzeugend, andererseits wird, bei Annahme der Theorie, diese Wachsthumserscheinung zurückführbar auf den mit dem Pepton combinirten Sauerstoff, das heisst wohl, auf eine reductionsfähige Substanz.

Ich will nun schliesslich noch in kurzer Uebersicht meine Ansichten über den Zusammenhang zwischen Gährung, Anaërobiose und Reductionsfuntion zusammenstellen und zwar in den folgenden Thesen.

1. Es giebt drei verschiedene Formen der Anaërobiose, nämlich, *Erstens*, die wahre facultative; *Zweitens*, die scheinbare facultative oder temporäre; *Drittens*, die obligate.

2. Die *Facultative Anaërobiose*, wie z. B. bei den industriellen Milchsäurefermenten, ist charactirisirt durch Unabhängigkeit vom freien Sauerstoff, wenn Reductionsfähiges Nährmaterial geboten ist.

Die *Temporäre Anaërobiose*, wie z. B. bei *Mucor racemosus*, den Alkoholhefen und einigen Gährungsbacterien, wie *Photobacterium phosphorescens*, beruht auf die Gegenwart einer gebundenen Sauerstoffreserve in den Zellen, welche bei den activen Alkoholhefen einzelne (zwanzig bis dreissig) Zelltheilungen erlaubt ehe aufs Neue Sauerstoffzutritt nothwendig ist. Findet letzterer dann nicht statt, so sterben die Zellen allmählich ab auch bei der Gegenwart günstiger, reductionsfähiger, lose gebundenen Sauerstoff enthaltender Nährung.

Die *Obligate Anaërobiose*, wie bei dem Butylfermente, erheischt vollständige Abwesenheit vom freien Sauerstoff und Gegenwart von reductionsfähigem Nährmaterial.

3. Gährungs- und Reductionsfunction sind von einander unabhängig. Dieses erhellt daraus, dass die temporär-anaërobe Alkoholhefe gährt ohne zu reduziren, während die temporär-anaërobe Leuchtbacterie *Photob. phosphorescens* gährt und zu gleicher Zeit reduzirt.

4. Gährung kann mit allen drei Formen der Anaërobiose combinirt vorkommen, und fehlt nur bei den vollständig aëroben Organismen.

5. Wahre facultative und obligate Anaërobiose sind unzertrennlich an reductionsfähigem Nährmaterial gebunden.

6. Die Reductionsfunction kann mit allen Formen der Anaërobiose, so wie mit der vollständigen Aërobiose combinirt vorkommen.

7. Die Facultativanaërobien sowie die Obligatanaërobien, können bei Abwesenheit von Substanzen, welche zugleich assimilations- und

reductionsfähig sind, oder auch bei Gegenwart wohl reductions-allein nicht assimilationsfähiger Stoffe und bei übrigens geeigneten Ernährungsbedingungen, scheinbar als Aërobien leben und wachsen, das heisst, dieselben erheischen dann freien Sauerstoff, wenn auch von niedrigerer Spannung.

Von diesen Thesen ist diese letztere die am wenigsten durchgearbeitete, ist aber, wie wir gesehen haben, für die Erklärung der biologischen Bedeutung der Gährungen von besonderer Wichtigkeit.

8. Die Gährfunction ist nothwendigerweise von Gasbildung begleitet, findet diese nicht statt, so ist das Wort Gährung nicht anwendbar. Gährung bezweckt durch die damit verknüpfte Gasbildung, die zu einer der drei Klassen der Anaërobien gehörigen Urheber, durch das Gas dem freien Sauerstoff entgegen zu führen. Das Functionsoptimum des dafür erwünschten Sauerstoffdruckes, liegt bei den Obligatanaërobien, bei Gegenwart reductionsfähiger Nahrung, bei 0, bei Abwesenheit reductionsfähiger Nahrung oberhalb 0, allein niedriger wie der Löslichkeit dieses Gases unter dem gewöhnlichen Luftdrucke entspricht.

Bacteriologisches Laboratorium
der Niederländischen Presshefefabrik,
Delft März 1893.

